

1/2425

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISION CELULAR EN TIMO HUMANO: EVOLUCION FENOTIPICA
Y FUNCIONAL DE POBLACIONES PRECORTICALES

Reg. F.M. 12.557

LUIS ALVAREZ VALLINA

1993

UNIVERSIDAD
AUTONOMA
DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
BIBLIOTECA

Reunido el Tribunal que suscribe en el día de la
fecha, acordó calificar la presente Tesis Doctoral
con la censura de APTO "CUM LAUDE" Por
UNANIMIDAD
Madrid, 21 OCTUBRE 1993



Francisco Sanjaume.



Emilio Gómez



UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA
DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
BIBLIOTECA

TESIS DOCTORAL

LUIS ALVAREZ VALLINA

**DIVISION CELULAR EN TIMO HUMANO: EVOLUCION FENOTIPICA
Y FUNCIONAL DE POBLACIONES PRECORTICALES.**

DIRECTOR: FERNANDO DIAZ-ESPADA LORENZO

DOCTOR EN CIENCIAS BIOLOGICAS

JEFE DE SECCION DEL SERVICIO DE INMUNOLOGIA

CLINICA PUERTA DE HIERRO

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

1993

CLÍNICA PUERTA DE HIERRO


CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES MÉDICO-QUIRÚRGICAS
LA SEGURIDAD SOCIAL

FERNANDO DIAZ-ESPADA LORENZO, Doctor en Ciencias Biológicas por la Universidad Complutense de Madrid, Jefe de Sección del Servicio de Inmunología de la Clínica Puerta de Hierro de Madrid

CERTIFICA: Que D. LUIS ALVAREZ VALLINA ha realizado bajo mi dirección un trabajo de investigación sobre:
"DIVISION CELULAR EN TIMO HUMANO: EVOLUCION FENOTIPICA Y FUNCIONAL DE POBLACIONES PRECORTICALES", con el objeto de su presentación para la obtención del grado de Doctor. Por la presente certificación acepto la consideración de Director de Tesis de acuerdo con las normas vigentes, y considero que esta Tesis está en condiciones de ser leída y juzgada.

Y para que conste donde proceda firmo la presente

Madrid, 3 de Septiembre de 1993



Fdo.: Fernando Díaz-Espada

AGRADECIMIENTOS:

A **Fernando**, por haber aceptado la dirección de este trabajo; por su afectuoso trato, sus oportunas críticas y múltiples enseñanzas a lo largo de estos años. Y, cómo no, por los numerosos cafés que tomamos con Hugh, de donde surgieron muchas e interesantes ideas.

A **Africa**, que me ayudó en momentos difíciles, y me hizo partícipe de sus conocimientos durante el año que trabajamos juntos; por su contagioso entusiasmo en numerosas discusiones y su amistad.

A **Miguel**, por las facilidades que me ha brindado para el desarrollo de este trabajo, por su cordialidad e inmejorable trato en todo momento.

A **Paco Gambón** del que, a pesar del poco tiempo que compartimos en el laboratorio, guardo un recuerdo entrañable; por sus enseñanzas con el citómetro.

A **Ma José Rubio**, en quien siempre encontré estímulo y apoyo, y a **Magdalena**, por su generosa colaboración. A las dos por su amistad.

A **Aresio**, que me ha proporcionado algunos de los reactivos utilizados en este trabajo y muchos consejos útiles. A **Mariví y Gloria**, por el ánimo que me impartieron en todo momento.

A todo el personal del Laboratorio de Histocompatibilidad (fuente inagotable de linfocitos), y especialmente a **Chelo**, por su inestimable colaboración.

A **Carlos**, por sus colaboraciones fotográficas (y por la PCR asimétrica), y a **Arantxa**, por su ayuda en la impresión de gráficas.

Al resto de mis compañeros del Laboratorio por la valiosa ayuda que me han prestado en todo momento.

Al Servicio de Cirugía Cardiopediátrica del Hospital Ramón y Cajal que nos ha proporcionado las muestras tímicas, indispensables para el desarrollo de este trabajo.

A **Francisco Torres**, de Coulter España, a **Carmen Rodríguez**, y a todo el equipo del Centro de Sandoval, por poner a mi disposición sus equipos de citometría.

A **Ana**, que me ha sufrido más, cuya ayuda ha sido fundamental en la elaboración de este trabajo; por su incondicional apoyo.

A mis padres

A Ana

aa:	aminoácido
7-AAD:	7-Amino-actinomicina D
Ac:	anticuerpo
AcMo:	anticuerpo monoclonal
ADN:	ácido desoxirribonucleico
Ag:	antígeno
APh:	afidocolina
ARN:	ácido ribonucleico
BCR:	receptor específico del linfocito B
BE:	bromuro de etidio
CD:	grupo de diferenciación
CDR:	regiones determinantes de complementariedad
CF:	citofluorometría de flujo
CM:	colcemida
cpm:	cuentas por minuto
DE:	desviación estándar
DEAE:	dietilaminoetil
DMSO:	dimetilsulfóxido
DN:	células dobles negativas
DNAsa:	desoxirribonucleasa
EDTA:	etilendiaminotetraacético
ELISA:	enzimoinmunoensayo
IFD:	inmunofluorescencia directa
IFI:	inmunofluorescencia indirecta
F(ab') ₂ :	fragmento de un Ac obtenido por tratamiento enzimático que contiene las regiones de reconocimiento específico
FITC:	isotiocianato de fluoresceína
FS:	dispersión frontal (forward scatter)
FSC:	suero bovino fetal
g:	unidad de gravedad
gr:	gramo
HLA:	moléculas de clase I del MHC
Ig:	inmunoglobulina
IL:	interleuquina
IP:	ioduro de propidio
Kd:	kilodalton
MHC:	complejo principal de histocompatibilidad
ND:	no determinado
PAGE:	electroforesis en gel de poliacrilamida
pb:	pares de bases
PCR:	reacción en cadena de polimerasa
PDBu ₂ :	12, 13 phorbol dibutirato
PE:	ficoeritrina
PF:	paraformaldehído
PKC:	protein kinasa C
PT:	pretimocitos
r:	recombinante
R:	receptor
RNAsa:	ribonucleasa
rpm:	revoluciones por minuto
SDS:	dodecil sulfato sódico
SP:	células simples positivas
SS:	dispersión ortogonal (side scatter)
TCR:	receptor específico del linfocito T
TN:	células triple negativas
UI:	unidades internacionales

INTRODUCCION

1. RECEPCION DE ESPERMATOZOIDAS DE RATON

2. RECONOCIMIENTO ANTICORPO DE ANTICUEROS ANTIESPERMATICOS

3. ACTIVACION DEL LIPOSOLO

4. DESARROLLO DE LAS OOCITOS EN CULTIVO

4.1. Experimentos y observaciones

4.2. Resultados estadísticos

4.3. Aprendizaje de los conceptos básicos de la fisiología de la reproducción

OBJETIVOS

MATERIALES Y MÉTODOS

1. PURIFICACION DE ESPERMIOZOIDAS DE RATON

1.1. Anestesia de Ratón (100g)

1.2. Disociación testicular

1.3. Separación de los espermios

2. PREPARACION DE LAS OOCITOS EN CULTIVO

2.1. Anestesia de Ratón (100g) y extracción de ovarios

2.2. Cultivo de oocitos en medio de cultivo de ratón

2.3. Caracterización de los oocitos en cultivo de ratón

2.4. Cultivos de oocitos en medio de cultivo de ratón

2.5. Observación de los oocitos en cultivo de ratón

INDICE

3. CULTIVOS DE OOCITOS

3.1. Caracterización de los oocitos en cultivo de ratón

INTRODUCCION

1. RECEPTORES ESPECIFICOS DEL SISTEMA INMUNE	1
2. RECONOCIMIENTO ANTIGENICO	4
3. ACTIVACION DEL LINFOCITO T	5
4. DESARROLLO DE LOS LINFOCITOS T EN EL TIMO	9
4.1. Expansión y muerte celular	11
4.2. Estadios madurativos	12
4.3. Aprendizaje tímico: selección positiva y negativa	14
OBJETIVOS	18

MATERIALES Y METODOS

1. PURIFICACION DE SUBPOBLACIONES CELULARES	21
1.1. Aislamiento de linfocitos T	21
1.2. Timocitos humanos	22
1.3. Subpoblaciones tímicas	22
2. PREPARACION DE LINEAS ESTROMALES TIMICAS HUMANAS	24
2.1. Aislamiento de células estromales tímicas	24
2.2. Cultivo de células estromales	25
2.3. Caracterización fenotípica	25
2.4. Cocultivos de células estromales y timocitos	26
2.5. Obtención de sobrenadantes de los cultivos de células estromales	26
3. CULTIVOS CELULARES	27
3.1. Condiciones generales	27

3.2. Ensayos proliferativos	27
3.3. Aditivos especiales utilizados en los cultivos	28
4. ANTICUERPOS MONOCLONALES	28
4.1. Producción y purificación de AcMos	28
4.2. Conjugación de AcMos con isotiocianato de fluoresceína	31
4.3. Preparación de inmunoabsorbentes mediante el acoplamiento de AcMos a Sepharosa 4B	32
5. ESTUDIOS DE FLUORESCENCIA	32
5.1. Estudio de antígenos de superficie celular	33
5.2. Estudio del ciclo celular	33
5.3. Estudio simultáneo de antígenos de superficie y ciclo celular	34
5.4. Análisis citofluorométrico	34
6. AISLAMIENTO Y ANALISIS DE PROTEINAS	35
6.1. Marcaje de proteínas de superficie con ^{125}I	35
6.2. Marcaje metabólico	35
6.3. Solubilización de proteínas celulares	36
6.4. Inmunoprecipitación de antígenos radiomarcados	37
7. AISLAMIENTO DE ARNm	38
8. SINTESIS DE LA PRIMERA CADENA DE ADNc Y AMPLIFICACION DE TRANSCRIPTOS ESPECIFICOS (TCR α Y TCR β) POR PCR	38

RESULTADOS

1. DIVISION CELULAR EN TIMO HUMANO	41
1.1. Estudio simultáneo del contenido de ADN y de la expresión de un antígeno de membrana	41

1.2. Estudio simultáneo del contenido de ADN y de la expresión de dos antígenos de membrana	43
2. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE SUBPOBLACIONES	
TIMICAS INMADURAS	48
2.1. Caracterización fenotípica	48
2.1.1. <u>Pretimocitos</u>	48
2.1.2. <u>Timocitos triple negativos</u>	49
2.1.3. <u>Timocitos CD3⁺8⁻</u>	49
2.1.4. <u>Timocitos CD3⁺4⁻</u>	54
2.1.5. <u>Timocitos corticales</u>	54
2.2. Estudio del ciclo celular en subpoblaciones tímicas	55
2.3. Estudio comparativo de la proliferación espontánea en timocitos CD3 ⁺ 8 ⁻ y en timocitos corticales	57
2.4. Respuestas proliferativas en subpoblaciones tímicas	59
2.4.1. <u>Respuestas proliferativas inducidas por la IL-2</u>	60
2.4.2. <u>Respuestas proliferativas inducidas por ésteres de phorbol</u>	60
3. VARIACIONES FENOTIPICAS DE LAS SUBPOBLACIONES	
TIMICAS PRECORTICALES CULTIVADAS IN VITRO	63
3.1. Variaciones fenotípicas espontáneas	65
3.2. Variaciones fenotípicas inducidas por la IL-2	74
4. INTERACCION DE SUBPOBLACIONES TIMICAS CON	
COMPONENTES ESTROMALES	75
4.1. Aislamiento y caracterización de una línea celular derivada del estroma tímico	75
4.2. Efecto de la línea celular PG/85 sobre la proliferación	

intratímica	77
4.3. Estudio de la viabilidad celular en cocultivos de la línea estromal PG/85 y subpoblaciones tímicas	81
4.4. Inducción de apoptosis en subpoblaciones tímicas por la línea estromal PG/85	81
4.5. Modificaciones fenotípicas experimentadas por los pretimocitos en presencia de células de origen estromal. Papel de la IL-2	86
4.6. Efecto de las células de origen estromal sobre la población CD3 ⁺ 8 ⁻	89
5. ESTUDIO DE LA EXPRESION DE DIFERENTES MOLECULAS RELACIONADAS CON LA DIFERENCIACION INTRATIMICA	94
5.1. Expresión de ARNm específicos	94
5.2. Marcaje metabólico	95
5.3. Expresión en superficie celular	97
<u>DISCUSION</u>	102
<u>ADDENDUM</u>	117
<u>CONCLUSIONES</u>	123
<u>APENDICE</u>	127
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	128

El sistema nervioso central (SNC) es el encargado de recibir y procesar la información que llega a él a través de los receptores sensoriales. La información que llega al SNC puede ser de origen interno (proveniente de los órganos internos) o externo (proveniente del entorno). El SNC está formado por el cerebro, el cerebelo y la médula espinal. El cerebro es el órgano más grande y complejo del SNC, y es el encargado de procesar la información y de generar las respuestas. El cerebelo es un órgano más pequeño que el cerebro, pero que también es muy importante para el control del movimiento y la coordinación. La médula espinal es un tubo largo que recorre la columna vertebral, y es el encargado de transmitir la información entre el cerebro y el resto del cuerpo.

1. RECEPTORES SENSORIALES

Los receptores sensoriales son los encargados de recibir la información que llega al SNC a través de los sentidos. Los receptores sensoriales pueden ser de dos tipos: receptores de tipo mecánico y receptores de tipo químico. Los receptores de tipo mecánico son los encargados de recibir la información que llega al SNC a través de los sentidos de la tacto, la presión, el dolor y la temperatura. Los receptores de tipo químico son los encargados de recibir la información que llega al SNC a través de los sentidos del gusto, el olfato y la visión.

El SNC está formado por el cerebro, el cerebelo y la médula espinal. El cerebro es el órgano más grande y complejo del SNC, y es el encargado de procesar la información y de generar las respuestas. El cerebelo es un órgano más pequeño que el cerebro, pero que también es muy importante para el control del movimiento y la coordinación. La médula espinal es un tubo largo que recorre la columna vertebral, y es el encargado de transmitir la información entre el cerebro y el resto del cuerpo.

INTRODUCCION

El sistema nervioso central (SNC) es el encargado de recibir y procesar la información que llega a él a través de los receptores sensoriales. La información que llega al SNC puede ser de origen interno (proveniente de los órganos internos) o externo (proveniente del entorno). El SNC está formado por el cerebro, el cerebelo y la médula espinal.

El sistema inmunitario de los vertebrados está formado por un conjunto de tejidos ampliamente distribuidos por el organismo, y por diferentes tipos celulares dotados de alta movilidad anatómica. Las células más representativas del sistema, linfocitos T y linfocitos B, son las que le confieren especificidad. Ambos tipos celulares presentan grandes similitudes morfológicas, se originan a partir de un precursor común y expresan en su membrana receptores específicos para diferentes estructuras antigénicas (epítopes) (1).

1. RECEPTORES ESPECIFICOS DEL SISTEMA INMUNE

Mientras que en los linfocitos B el receptor para el antígeno (BCR) es una molécula de inmunoglobulina (Ig) (2), en los linfocitos T la especificidad es proporcionada por una estructura homóloga denominada receptor de la célula T (TCR) (3, 4). Ambos tipos de receptores son heterodímeros, unidos por puentes disulfuro, que pueden reaccionar individualmente con un único determinante antigénico.

El TCR está constituido por dos cadenas polipeptídicas clonalmente variables (T_i), evolutiva y funcionalmente relacionadas con las cadenas polipeptídicas de las inmunoglobulinas. Hay cuatro familias distintas de genes que codifican las cadenas T_i : α , β , γ y δ , pero cada linfocito T utiliza solamente uno de los dos heterodímeros posibles α/β ó γ/δ (los mecanismos responsables de estos apareamientos exclusivos no son conocidos). De los dos tipos de receptores, el constituido por las cadenas α/β (de 43-49 y 38-44 Kd, respectivamente) está presente en la mayoría de las células T de sangre periférica (5), mientras que el formado por las cadenas γ/δ (de 55 y 40-45

Kd, respectivamente) se expresa solamente en un 5-10% de los linfocitos T (6, 7).

Ambos tipos de receptores α/β y γ/δ se asocian de modo no covalente, en la superficie celular, con un grupo de proteínas clonalmente invariables, denominado colectivamente CD3. El complejo CD3 está constituido por cinco cadenas polipeptídicas (γ , δ , ϵ , ζ , η) involucradas en la inserción en membrana del TCR y en la transmisión, al interior celular, de las señales originadas tras el contacto del receptor con el antígeno correspondiente (8). Las subunidades CD3 γ , δ y ϵ , al igual que las cadenas Ti (α , β , γ y δ), son miembros de la superfamilia génica de las inmunoglobulinas, mientras que las cadenas ζ y η pertenecen a una familia génica diferente (9).

Las cadenas del TCR tienen un tallo intracitoplasmático muy corto (4-10 aa), y una región transmembrana que presenta residuos básicos, interrumpiendo la secuencia hidrofóbica mayoritaria (10). Se ha planteado que estos residuos participan en el establecimiento de interacciones de carga con residuos ácidos en los dominios transmembrana del CD3, facilitando el ensamblaje y manteniendo la estabilidad del complejo (10, 11). Dado el papel fundamental que parecen desempeñar las cargas transmembrana en la determinación de las interacciones entre las diferentes subunidades del receptor, se ha propuesto un modelo que optimiza estas interacciones y mantiene la electroneutralidad del complejo TCR-CD3, según el cual el receptor podría incluir dos heterodímeros Ti en asociación con dos heterodímeros ϵ ($\epsilon\delta$ y/o $\epsilon\gamma$), y un dímero de la familia ζ ($\zeta\zeta$ ó $\zeta\eta$) situado simétricamente respecto a las cadenas α ó β de cada uno de los heterodímeros Ti del complejo (8, 12, 13). En este sentido, aunque se ha sugerido que diferentes formas funcionales del complejo TCR-CD3 (CD3 δ : $\alpha\beta\delta\epsilon\zeta\zeta$ y CD3 γ :

$\alpha\beta\gamma\epsilon\zeta\zeta$) podrían ser expresadas independientemente en la superficie celular (12, 13), resultados obtenidos en clones T citolíticos y en células Jurkat indican que la expresión de un complejo TCR-CD3 (α/β) plenamente funcional requiere la producción simultánea de las cadenas CD3 γ y CD3 δ (14, 15).

La existencia de un número potencialmente ilimitado de estructuras antigénicas requiere que el número de receptores (repertorio de especificidades), capaces de unirse a ellas con la afinidad suficiente para activar las células linfoides, sea muy grande. Esta gran diversidad de receptores se genera durante el desarrollo ontogénico de los linfocitos en los órganos linfoides primarios, a través de una secuencia de reordenamientos génicos programados (16, 17). Los receptores antigénicos de los linfocitos T presentan en cada cadena polipeptídica una región constante (C) y una región variable (V) homólogas a las regiones C y V de las inmunoglobulinas. Las regiones V de cada cadena (α y β) son contiguas espacialmente, y residuos de ambas contribuyen a la formación del centro activo (parátipe) de la molécula (16). La gran variabilidad individual en las secuencias de las regiones que reconocen los posibles epítopes antigénicos (regiones V), es consecuencia de la diversidad de segmentos génicos que las codifican (VDJ en β y δ y VJ en α y γ), de la diversidad combinatoria generada durante el reordenamiento intergénico de estos segmentos, y de fenómenos de adición de nucleótidos y variaciones en el punto de rotura/unión (16). Estos procesos de recombinación están confinados a estadíos precoces de la maduración de las células T y generalmente concluyen cuando el linfocito es capaz de expresar un receptor completo. El resultado final es que cada linfocito T está comprometido para una especificidad de reconocimiento única (especificidad clonal) (18).

2. RECONOCIMIENTO ANTIGENICO

La característica más inequívoca del receptor de la célula T que le distingue de otros receptores del sistema inmune, es la naturaleza de su ligando. Mientras que el receptor específico del linfocito B (Ig) reconoce regiones superficiales (epítopes) del antígeno en su forma nativa (19), el TCR (α/β) reconoce un complejo bimolecular formado por fragmentos peptídicos asociados con moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) expresado en la membrana de otra célula (20, 21, 22). Esta función constitutiva de las moléculas del MHC, imprescindible en el proceso de reconocimiento específico de los linfocitos T, se conoce como restricción MHC. Las moléculas del MHC están involucradas en el tráfico intracelular y transporte hacia la superficie celular de péptidos derivados del catabolismo proteico (23). Como resultado de este proceso, las proteínas del MHC exhiben simultáneamente en la superficie celular un amplio espectro de péptidos, durante un período de tiempo suficiente para que el repertorio de células T pueda examinar la célula eficazmente (24).

Aunque se han observado excepciones, la presentación de péptidos por las moléculas MHC de clase I ó II se correlaciona con el origen de la molécula antigénica. Los péptidos derivados de proteínas sintetizadas endógenamente (proteínas propias o proteínas virales en células infectadas) se asocian con moléculas de clase I, mientras que los péptidos derivados de moléculas exógenas, endocitadas y degradadas en el compartimento lisosomal, se asocian con proteínas de clase II (25, 26).

Las moléculas del MHC son glicoproteínas integrales de membrana, altamente polimórficas, constituidas por la asociación no covalente de dos

cadenas polipeptídicas. Mientras que las moléculas de clase I se expresan prácticamente en todas las células del organismo, las moléculas de clase II poseen una distribución tisular mucho más restringida, siendo expresadas en condiciones fisiológicas en unos pocos tipos celulares: macrófagos, células dendríticas y linfocitos B (26, 27). La captación de péptidos por las moléculas del MHC se realiza en una zona especializada situada en la parte N-terminal de la molécula, donde se concentran la mayoría de los residuos polimórficos. Este sitio de unión antigénica (desétope) está constituido por una plataforma en hoja plegada β , coronada por dos hélices α paralelas situadas lateralmente (28, 29). En las moléculas de clase I la cavidad de unión peptídica está formada por los dos dominios N-terminales de la cadena α ($\alpha 1$ y $\alpha 2$), mientras que en las moléculas de clase II participan los dominios externos de ambas cadenas ($\alpha 1$ y $\beta 1$) (28, 30).

Se ha propuesto, en base a la semejanza de secuencias, que el centro activo del TCR o parátipe podría presentar una organización espacial similar a la de las Igs, de manera que los residuos de contacto con el antígeno se sitúen en zonas de gran variabilidad (homólogas a las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de las Igs) de las regiones $V\alpha$ y $V\beta$ (31, 32). Las regiones CDR3 de las cadenas α y β del TCR interaccionarían preferentemente con los residuos expuestos del péptido (epítipe), mientras que las regiones de menor variabilidad (CDR1 y CDR2) de ambas cadenas contactarían con residuos de las hélices α del MHC, que flanquean las regiones laterales del desétope (33).

3. ACTIVACION DEL LINFOCITO T

Los linfocitos T pueden interaccionar, a través de su receptor

específico, con el complejo péptido-MHC iniciándose en la célula un proceso de activación con posterior división, diferenciación y expresión de sus capacidades efectoras (34). Sin embargo, el reconocimiento de la combinación péptido antigénico-molécula MHC por el complejo TCR-CD3, aunque necesario, no es suficiente para inducir la plena activación de la mayoría de las células T (18). Otras moléculas de superficie expresadas por los linfocitos T desempeñan un papel fundamental durante el proceso de activación iniciado por el antígeno, actuando bien como receptores de factores solubles (interleuquinas) secretados por células auxiliares (estimulación paracrina) o por el propio linfocito T (estimulación autocrina), o bien como receptores de otras moléculas de superficie expresadas en la célula presentadora (18). En términos generales, estas moléculas accesorias pueden actuar en funciones de adhesión, facilitando la interacción entre el linfocito T y la célula portadora del antígeno, o bien regulando las señales transmembrana iniciadas a través del receptor específico. De particular importancia funcional son las moléculas CD8 y CD4, que reconocen determinantes no polimórficos de las proteínas de clase I y II (35, 36), y las distintas isoformas de la molécula CD45 cuyo ligando es desconocido (37).

Las moléculas CD4 y CD8 son expresadas por los linfocitos T α/β^+ maduros de forma mutuamente exclusiva (38). La presencia individualizada de CD4 ó CD8 en la superficie de las células T permite definir dos subpoblaciones que difieren en sus respuestas efectoras y en su patrón de restricción. Los linfocitos T CD4⁺ tienen, en general, una función reguladora de la respuesta inmune (humoral y celular) y su receptor específico interacciona con complejos péptido-clase II, mientras que los linfocitos T CD8⁺ poseen, en general, actividad citotóxica y su receptor interacciona con

complejos péptido-clase I (27). Además de su papel en los procesos de reconocimiento específico del MHC, las moléculas CD4 y CD8 están implicadas en el proceso de activación del linfocito T a través de una tirosin kinasa ($p56^{lck}$), que se asocia de modo no covalente a los dominios intracitoplásmicos de ambas moléculas (39, 40).

Numerosas evidencias indican que el receptor específico del linfocito T debe ser considerado como una estructura multimérica modular, formada por al menos tres complejos moleculares de membrana interdependientes que desempeñan funciones esenciales durante el proceso de activación: el heterodímero $Ti\ \alpha/\beta$ asociado con el complejo CD3, los correceptores CD4 ó CD8 y la molécula CD45 (18).

Como consecuencia del reconocimiento del complejo péptido-MHC por el receptor específico del linfocito T en la superficie de la célula presentadora, se va a generar una señal que es transmitida al interior celular por el complejo CD3. Esta señal se integra con otras señales recibidas a través de otras moléculas de superficie de la célula T, lo que produce la generación de diferentes mediadores bioquímicos intracelulares que condicionan cambios en el patrón de expresión génica (41). Uno de los eventos intracelulares más tempranos es la hidrólisis de fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP_2) por la fosfolipasa C (PLC), para generar inositol-1,4,5-trifosfato (IP_3) y diacilglicerol (DAG), que originan un aumento de la concentración de calcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) y la activación de la protein kinasa C (PKC), respectivamente (34, 42, 43). Experimentos recientes indican que el acoplamiento del complejo TCR-CD3 a la PLC depende de una(s) tirosin kinasa(s). Ninguna de las subunidades del CD3 posee actividad tirosin kinasa intrínseca en su dominio citoplasmático, por lo que

se ha sugerido que el TCR-CD3 está acoplado (no covalentemente) a una tirosin kinasa. No obstante la naturaleza de esta tirosin kinasa proximal que activa la PLC se desconoce (44).

Estos acontecimientos iniciales se potencian si la molécula CD45, dotada de actividad tirosin fosfatasa, y los correceptores CD4 ó CD8, con su actividad tirosin kinasa asociada ($p56^{lck}$), se reagrupan en la proximidad del complejo TCR-CD3 durante el reconocimiento antigénico (45).

La activación de la PKC junto con los incrementos del calcio intracelular actuarán de forma sinérgica induciendo, a través de una serie de procesos mal conocidos, la rápida movilización de determinados factores de transcripción implicados en procesos de inducción génica (46). Entre los genes de respuesta inducidos cabe destacar los genes de la interleuquina 2 (IL-2) y los de su receptor (IL-2R), cuyos productos proteicos regularán la proliferación de la célula T por una vía autocrina/paracrina (IL-2/IL-2R) (46).

En condiciones fisiológicas, la capacidad de la IL-2 para inducir la progresión del linfocito T a través del ciclo celular, depende de su unión con receptores de alta afinidad. El receptor de la IL-2 es un complejo multimérico compuesto al menos por tres cadenas: cadena α (p55 ó TAC), cadena β (p75) y cadena γ (47). La expresión de diferentes combinaciones de estos tres componentes origina diversos tipos de receptores con diferentes afinidades para la IL-2. Aunque la combinación de las cadenas β y γ es necesaria para la transducción de señales, la constitución de receptores de alta afinidad requiere también la participación de la cadena α .

Además de la vía iniciada a través del "módulo" de activación definido por el complejo TCR-CD3, los correceptores CD4/CD8 y la molécula CD45;

otros antígenos de membrana (CD2, CD5, CD28, CD69, etc.) pueden participar en la activación o en la regulación de las respuestas proliferativas de los linfocitos T (48, 49). En este sentido, se ha planteado que la ausencia de determinadas señales auxiliares, proporcionadas por factores secretados por la célula presentadora (IL-1 α y β , IL-6, TNF α , etc.) o a través de contactos celulares mediados por moléculas de membrana del linfocito T (CD2, CD28, LFA-1, VLA-4, etc.) y de la célula presentadora (LFA-3, B7/BB-1, ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1, etc.), pueden originar la activación abortiva (eliminación o anergia clonal) del linfocito T (50). En conjunto estas señales coestimuladoras pueden desempeñar un papel fundamental durante la fase de reconocimiento específico del linfocito T, determinando las consecuencias de la ocupación del TCR, proceso que puede ser la base de los mecanismos de inducción de tolerancia antígeno específica en células T maduras (51).

4. DESARROLLO DE LOS LINFOCITOS T EN EL TIMO

La mayoría de los linfocitos T, a diferencia de otras células hematopoyéticas, se generan en el timo, órgano especializado en la expansión, diferenciación y estricta selección de sus precursores. Como consecuencia de este programa de desarrollo, los linfocitos T adquieren la capacidad de reconocer los antígenos asociados a moléculas del MHC (restricción MHC) idénticas a las expresadas por las células del individuo, y son tolerantes (no reactivos) a los propios componentes del organismo (52).

El timo es un órgano linfoepitelial de morfología bilobulada, situado en el mediastino ántero-superior. Aunque su posición anatómica puede variar, su estructura celular básica está muy conservada entre las diferentes

especies de vertebrados estudiados. El parénquima tímico está constituido por una malla de células epiteliales de diferentes tipos, sobre la que anidarán las células linfoides, y distintos tipos de células hematopoyéticas no linfoides (macrófagos y células dendríticas) (53).

Cada lóbulo tímico está rodeado por una delgada cápsula de tejido conectivo desde donde parte un sistema de tabiques o trabéculas que lo dividen en lobulillos. A nivel histológico, dentro de cada lobulillo se pueden distinguir tres áreas principales, presentando cada una de ellas una composición linfoide y estromal característica. Una región situada inmediatamente por debajo de la cápsula conectiva (zona subcortical), donde se localizan células de aspecto blástico; una región externa de gran celularidad o corteza que ocupa la mayor parte del lobulillo y, una porción interna o médula caracterizada por la presencia de corpúsculos de Hassall (53, 54).

El tamaño del timo es considerable a lo largo de la vida fetal y durante los primeros años de vida postnatal, pero disminuye conforme aumenta la edad del individuo, experimentando además un proceso progresivo de infiltración grasa. Sin embargo, aun en edades avanzadas es posible identificar pequeños islotes de tejido tímico que contienen todas las poblaciones linfoides y estromales observadas en individuos jóvenes (55).

El desarrollo intratímico de los linfocitos T es completamente dependiente, tanto durante la vida fetal como en la vida postnatal, del aporte constante de células precursoras que acceden al timo probablemente a través de las vénulas de endotelio alto de la región corticomedular (56). Aunque durante muchos años se asumió que antes de su llegada al timo, los precursores linfoides debían experimentar un proceso de diferenciación,

datos recientes indican que células pluripotenciales inyectadas intratímicamente pueden responder directamente al microambiente tímico y desarrollarse como timocitos (57, 58). Por ello en condiciones fisiológicas, debido al poderoso efecto inductor que ejerce el microambiente tímico, el proceso de compromiso hacia el linaje T puede consistir en la adquisición de un receptor que condicione la migración selectiva de los precursores hacia el timo, aunque éstos mantengan aún la capacidad de respuesta a factores de inducción mieloide (18).

4.1. Expansión y muerte celular

Uno de los acontecimientos iniciales del programa de desarrollo de las células T que ocurre tras el proceso de colonización, es la expansión celular (59). En este sentido, diferentes trabajos realizados *in vivo* en ratones y cobayas mediante la incorporación de precursores radiactivos, han demostrado que la mayoría de las células en división se localizan en las regiones subcapsular y cortical (60). Estudios cinéticos realizados en sistemas murinos han estimado que la producción diaria de timocitos es de aproximadamente 5×10^7 , de los cuales sólo una pequeña proporción (1-5%) son exportados a la periferia (61). La discrepancia entre generación celular y maduración/exportación, refleja la existencia de un alto índice de mortalidad celular que es consecuencia de la actuación de dos tipos de procesos: selección negativa y muerte por ausencia de señal (ver más adelante). Los fenómenos de muerte celular observados durante el desarrollo intratímico de los linfocitos T, ocurren a través de un proceso de muerte programada (apoptosis), durante el cual se activan endonucleasas dependientes de Ca^{2+}

y Mg^{2+} que originan la fragmentación del ADN nuclear, actuando sobre las regiones ligadoras internucleosómicas (62). Posteriormente, la célula sufre importantes cambios morfológicos, fundamentalmente a nivel de la membrana plasmática, que van a originar su fragmentación y la formación de unas estructuras denominadas cuerpos apoptóticos que son rápidamente eliminados *in vivo* por las células fagocíticas (63, 64).

4.2. Estadios madurativos

El desarrollo de los AcMos ha permitido obtener una descripción bastante detallada de los diferentes estadios madurativos que atraviesan los progenitores linfoides, y de su correspondiente localización intratímica. La expresión diferencial de determinadas moléculas de superficie permite dividir a los timocitos en tres poblaciones principales: pretimocitos, timocitos corticales y timocitos medulares, que corresponden a tres estadios madurativos sucesivos (65).

Los pretimocitos (PT), que representan aproximadamente el 1% del total de las células tímicas, se localizan predominantemente en la región subcapsular de la corteza. Se trata de una población muy heterogénea con un gran potencial proliferativo, que proviene directamente de los precursores procedentes de la médula ósea. La mayoría de los PT expresan los antígenos CD2, CD7 y moléculas MHC de clase I (HLA), pero carecen de CD1, CD3 y de las moléculas correceptoras CD4 y CD8 (células negativas dobles) (66, 67).

Los timocitos corticales representan la población linfóide tímica mayoritaria (85%). Son células pequeñas que se localizan preferentemente en la parte profunda de la corteza. Está plenamente aceptado que los timocitos

corticales provienen de la diferenciación de la subpoblación anterior (PT), y son precursores de las células maduras (medulares) (68). Fenotípicamente se caracterizan por expresar simultáneamente las moléculas CD4 y CD8 (células positivas dobles), así como las moléculas de la familia CD1: CD1a, CD1b y CD1c (66). Las moléculas de esta familia (cinco miembros en humanos: CD1a-d) se caracterizan por presentar un patrón de expresión tisular restringido (fundamentalmente timocitos corticales y células dendríticas) y una estructura similar a las moléculas MHC de clase I (heterodímero constituido por una cadena pesada asociada con la $\beta 2$ -microglobulina), aunque carente de polimorfismo (69). Estudios anteriores realizados en nuestro laboratorio han demostrado que en los timocitos corticales la expresión de CD1 tiene una correlación inversa con la expresión de moléculas MHC de clase I (66). Durante este estadio de diferenciación se detecta por primera vez la expresión en la superficie celular del receptor específico (TCR-CD3), aunque a niveles mucho menores que los observados en las células maduras (medulares) (70).

Los timocitos medulares representan aproximadamente un 10-15% de la población tímica total, están localizados en la región de la médula tímica, y presentan un fenotipo similar al de los linfocitos T maduros: carecen de CD1, presentan de forma individualizada los antígenos CD4 (10%) y CD8 (5%), y expresan en su membrana altos niveles de moléculas MHC de clase I y de CD3 (TCR) (65).

Los genes que codifican el receptor α/β se reordenan de forma secuencial durante el desarrollo de los linfocitos T. El reagrupamiento de la cadena TCR β ocurre en estadios muy inmaduros (CD3⁺4⁺8⁺) con anterioridad al de la cadena TCR α (71). En este sentido, resultados obtenidos en ratones

transgénicos plantean que durante los estadios tempranos del desarrollo (transición CD4⁸→CD4⁸), la expresión en superficie de la cadena TCR β del receptor, en ausencia de otras cadenas TCR, podría controlar diferentes aspectos del proceso madurativo de los linfocitos T (expansión celular, expresión de moléculas correceptoras CD4/CD8, exclusión alélica de los genes TCR β e inicio de la transcripción del locus TCR α) (72, 73).

4.3. Aprendizaje tímico: Selección positiva y negativa

El timo no sólo es capaz de proporcionar un microambiente apropiado para la proliferación y maduración de los linfocitos T, sino que constituye el órgano donde se selecciona el repertorio (potencial de reconocimiento) de receptores de las células T (52). Se ha planteado que las células del linaje T, como principio general, podrían estar destinadas a morir a menos que reciban las señales apropiadas a través de su receptor específico (74). Esta regla de "vida y muerte" parece razonable en un sistema celular que debe seleccionar un repertorio de receptores limitado, a partir de un número casi ilimitado de posibilidades, que varían desde especificidades autoagresivas, hasta fallos en la expresión de receptores debidos a la existencia de reordenamientos génicos no productivos. De forma que durante la selección del repertorio primario, únicamente se permitirá la maduración (rescate) de aquellos timocitos cuyos receptores reconozcan moléculas del MHC presentes en el timo (selección positiva), y se eliminarán aquellas células que posean capacidad autorreactiva (selección negativa) (52). Ambos procesos están determinados por la especificidad del receptor y son consecuencia de la interacción de los mismos componentes moleculares: porción variable del TCR α/β , proteínas del

MHC (expresadas en células estromales específicas) y moléculas correceptoras CD4/CD8 (75). La expresión en la superficie celular del complejo TCR α / β -CD3 constituye pues un hecho crucial en el desarrollo madurativo de las células T, al capacitarlas para interactuar con su ligando específico (epítipo antigénico-MHC). Otras moléculas implicadas en funciones de adhesión celular (CD2, LFA-1, etc.) participan también en los fenómenos de interacción entre timocitos y células epiteliales o dendríticas, aunque su papel en los procesos de selección en sí, es desconocido (76, 77).

La selección positiva es el proceso clave a través del cual se controla la producción de células T maduras, no sólo proporcionando acceso a la maduración, sino determinando la especialización funcional de las células seleccionadas (78). A diferencia de la selección negativa, que puede ser inducida por complejos péptido-MHC (y por una amplia variedad de ligandos) presentados por células de diferentes orígenes, incluso extratímicas (79, 80); la selección positiva es mucho más exigente en sus requisitos dado que parece ocurrir únicamente en la corteza tímica, y estar mediada específicamente por células epiteliales (81). Sin embargo, las bases moleculares de este proceso permanecen como una de las cuestiones más debatidas del desarrollo de los linfocitos T.

En ausencia de las señales de rescate apropiadas (selección positiva), los timocitos CD4⁺8⁺ con baja expresión de TCR (cuya generación es TCR-independiente) serán eliminados a través de un mecanismo de muerte programada (apoptosis) (82), mientras que las células seleccionadas positivamente incrementarán el nivel de expresión de HLA y CD3, e iniciarán el proceso de conversión en células fenotípicamente maduras (CD4⁺8⁻ ó CD4⁺8⁺) (78).

Uno de los grandes enigmas del proceso de desarrollo de los linfocitos T, es la capacidad de la molécula TCR-CD3 de originar la maduración (selección positiva) o la muerte (selección negativa) de los timocitos, y posteriormente iniciar la activación de los linfocitos T maduros. Esto se ha tratado de explicar invocando diferencias en la afinidad de las interacciones ligando-receptor y en la naturaleza de las células estromales implicadas (18). No obstante, se han sugerido también otras hipótesis que aluden a diferencias en las vías de transmisión de señales (en relación con el estadio de diferenciación), e incluso a la existencia de ligandos específicos que condicionan la selección positiva (83, 84).

El modelo de selección por afinidad plantea que si ambos procesos (selección positiva y negativa) fuesen consecuencia de la interacción con el mismo ligando (péptido-MHC), las diferencias de afinidad podrían determinar la existencia de selección y el tipo de la misma, de forma que aquellos timocitos que interaccionasen a través de su receptor específico con afinidad baja, serían seleccionados positivamente, mientras que aquellos que lo hiciesen con afinidad alta serían eliminados (selección negativa) (85, 86).

Otro modelo propone que los procesos de selección están compartimentalizados, debido a que las señales proporcionadas por las células dendríticas y por las células epiteliales son cualitativamente diferentes, de modo que aquellas células estromales que son capaces de proporcionar señales coestimuladoras típicas (células dendríticas) inducirían selección negativa, mientras que aquellas que no lo son (células del epitelio cortical) inducirían selección positiva (79, 87, 88). En este sentido, se ha propuesto que un aspecto esencial en la selección positiva podría consistir en evitar la integración de las señales de activación, generadas a través del TCR, con

señales generadas a través del CD28 (18).

Una variante del modelo de afinidad que integra el concepto de compartimentalización, sugiere que las diferencias en la respuesta podrían estar en relación con la densidad de los determinantes péptido-MHC exhibidos por las células estromales que participan en los procesos de selección (89, 90, 91).

Igualmente y en función de la arquitectura modular que presenta el complejo TCR-CD3, se ha sugerido que la utilización controlada (durante el desarrollo) de diferentes combinaciones de módulos, podría condicionar cambios (cuantitativos o cualitativos) en el acoplamiento del receptor a las moléculas efectoras citoplasmáticas y, en consecuencia, una variación en la capacidad de transmisión de señales en distintos estadios de diferenciación de los linfocitos T (44).

El último paso del programa de desarrollo intratímico, implica la conversión de las células seleccionadas en linfocitos T plenamente competentes. Aunque las bases moleculares del proceso que conlleva la adquisición del patrón de respuesta (génica) apropiado a la especificidad del receptor, no son conocidas, es probable que la maduración funcional ocurra durante el tiempo de residencia de los timocitos en la región medular (92).

El estudio de los mecanismos de regulación de la actividad de los genes en el desarrollo y en la diferenciación celular es un tema de gran importancia en la biología molecular. En particular, el estudio de los factores de transcripción y de los elementos reguladores del ADN es fundamental para comprender cómo se controla la expresión génica en diferentes tipos celulares y en diferentes etapas del desarrollo. Este trabajo se centra en el estudio de los factores de transcripción que regulan la expresión de los genes implicados en la diferenciación celular, con especial énfasis en el estudio de los factores de transcripción que regulan la expresión de los genes implicados en la diferenciación de las células madre en células especializadas.

El estudio de los factores de transcripción es un campo de investigación muy activo y en constante crecimiento. En los últimos años, se han desarrollado nuevas técnicas de estudio de los factores de transcripción, como el uso de anticuerpos específicos, el uso de reporteros genéticos y el uso de técnicas de secuenciación de alto rendimiento. Estas técnicas han permitido obtener una mayor comprensión de los mecanismos de regulación de la actividad de los genes y de los factores de transcripción que participan en estos procesos.

Trabaja en el estudio de los factores de transcripción que regulan la expresión de los genes implicados en la diferenciación celular, con especial énfasis en el estudio de los factores de transcripción que regulan la expresión de los genes implicados en la diferenciación de las células madre en células especializadas. El objetivo principal de este trabajo es determinar los factores de transcripción que regulan la expresión de los genes implicados en la diferenciación de las células madre en células especializadas, y estudiar el papel de estos factores en la regulación de la actividad de los genes.

OBJETIVOS

1. Estudio in vivo de la actividad de los factores de transcripción que regulan la expresión de los genes implicados en la diferenciación celular.

El estudio de los mecanismos de diferenciación intratímica de los linfocitos T ha progresado notablemente en los últimos años gracias al desarrollo de nuevos sistemas experimentales. El desarrollo de los AcMos ha permitido obtener una descripción bastante detallada de los diferentes estadios madurativos que atraviesan los progenitores linfoides, y de su correspondiente localización intratímica. Por otra parte, y dado que la generación de células T inmunocompetentes requiere la influencia de un microambiente tímico intacto, el estudio de las interacciones linfo-estromales ha recibido considerable atención, en un intento de conocer la naturaleza de las señales proporcionadas por células no linfoides situadas en los diferentes compartimentos tímicos.

El empleo de ratones transgénicos y los estudios cinéticos realizados *in vivo* en modelos murinos, mediante la administración de compuestos radiactivos o la inyección intratímica de precursores, han aportado considerable información en relación a los mecanismos de selección del repertorio específico de los linfocitos T, y del proceso de expansión celular. Obviamente, consideraciones éticas impiden utilizar en humanos abordajes experimentales similares, lo cual ha condicionado que estos aspectos del desarrollo intratímico sean menos conocidos.

Trabajos anteriores realizados en nuestro laboratorio sobre la delimitación y análisis de las propiedades de diferentes subpoblaciones tímicas, nos han permitido abordar el estudio de ciertos aspectos de la proliferación intratímica y de las relaciones de diferenciación interpoblacionales, que pueden resumirse en los siguientes puntos:

1. Estudio *in situ* de la proliferación celular mediante la caracterización

fenotípica de las células en división, empleando sistemas de citometría multiparamétrica, para intentar definir las principales poblaciones en proliferación.

2. Aislamiento de subpoblaciones inmaduras en distintos estadios de diferenciación, para determinar el estado del ciclo celular y definir aspectos fenotípicos y funcionales de las mismas:

2.1. Estudio comparativo de los requerimientos de activación de estas subpoblaciones tímicas, en presencia de IL-2 y de un activador específico de la protein kinasa C (PKC), mediante el análisis de las respuestas proliferativas.

2.2. Estudio de las variaciones fenotípicas experimentadas *in vitro* por diferentes subpoblaciones inmaduras espontáneamente y en presencia de IL-2.

2.3. Estudio de las interacciones entre líneas celulares estromales de origen mesenquimatoso y subpoblaciones tímicas en diferentes estadios madurativos.

2.4. Análisis de las consecuencias de esta interacción respecto a la respuesta proliferativa, viabilidad celular, contenido de ADN celular y fenotipo.

2.5. Estudio de la expresión de las subunidades del TCR α/β en

subpoblaciones tímicas inmaduras.

3. Integración de los resultados obtenidos en este trabajo en el modelo prevalente de diferenciación intratímica, y su posible aportación a la comprensión de los fenómenos de selección del repertorio.

1. PURIFICACION DE SUBPOBLACIONES CELULARES

1.1. Aislamiento de linfocitos T

Los linfocitos T se aislaron de sangre periférica de donantes voluntarios sanos. Las células mononucleares se obtuvieron por centrifugación (600xg, 30 minutos) de sangre heparinizada, diluida 1:1 en suero salino fisiológico (SSF), sobre Ficoll-Hypaque (Lymphoprep, Nycomed AS, Oslo, Noruega). Las células de la interfase se lavaron 2 veces (270xg, 10 minutos) con BSS-FCS1% (BSS: CaCl_2 0,14 g l^{-1} ; NaCl 8 g l^{-1} ; KCl 0,4 g l^{-1} ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2 g l^{-1} ; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,2 g l^{-1} ; KH_2PO_4 0,06 g l^{-1} ; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,24 g l^{-1} ; pH 7,4; FCS: suero bovino fetal. Flow Laboratories, Irvine, Escocia, GB).

Los monocitos y las células B se eliminaron de la preparación mediante adherencia a plástico, lisis con un AcMo anti-MHC clase II (DR) más complemento y filtración en columna de nylon. La adherencia a plástico se realizó mediante incubación de las células durante 1 hora a 37°C sobre placas de Petri (Costar, Cambridge, MA, EE.UU.), previamente tratadas durante 1 hora a 37°C con RPMI 1640 (Whittaker Bioproducts, Walkersville, MD, EE.UU.) suplementado con FCS al 20%. Las células adherentes (utilizadas posteriormente como células accesorias), se recuperaron mediante agitación suave con PBS-EDTA 0,5 mM; pH 7,2 (PBS: NaCl 8 g l^{-1} ; KCl 0,2 g l^{-1} ; Na_2HPO_4 1,15 g l^{-1} ; KH_2PO_4 0,2 g l^{-1}).

Los linfocitos T se obtuvieron de la fracción "no adherente" mediante tratamiento con el AcMo Q2.70 (anti-DR) (1 $\mu\text{g}/10^7$ células), durante 30 minutos a 4°C, y lisis con complemento de conejo (Cederlaine Laboratories,

Ontario, Canada) a una dilución 1:3, durante 45 minutos a 37°C, en presencia de DNAsa (10 µg/ml) (Sigma Chemical Co., San Luis, MO, EE.UU.). Las células muertas se eliminaron por filtración a través de una columna de nylon (Dupont, Boston, MA, EE.UU.). Tras preincubar la columna con medio completo durante 45 minutos a 37°C, se aplicaron las células incubándolas durante 1 hora a 37°C. Después de este paso las células filtradas se lavaron 2 veces con BSS-FCS1%. La viabilidad celular, medida por incorporación de azul tripán, fue siempre superior al 98%.

1.2. Timocitos humanos

Los timocitos se obtuvieron de timos extraídos de pacientes menores de 5 años, sometidos a cirugía cardíaca correctora. Tras fragmentar el timo, excluyendo las zonas hemorrágicas, se preparó una suspensión celular tamizando los fragmentos a través de una malla metálica con un diámetro de poro de 80 µm. Las células así obtenidas, se lavaron 2 veces en BBS-FCS5% y se resuspendieron en medio completo.

1.3. Subpoblaciones tímicas

Las diferentes subpoblaciones tímicas (Tabla I) se obtuvieron a partir de suspensiones de timocitos totales mediante selección negativa, tras 2 ó 3 tratamientos secuenciales con AcMos más complemento de conejo (1:3) en presencia de DNAsa (10 µg/ml), utilizando un mínimo de 20 µg de Ac por 10⁹ células tímicas.

En algunos casos tras el proceso de lisis, las células se aplicaron a una

TABLA I. Antígenos de selección empleados para la obtención de subpoblaciones tímicas

Antígenos de Selección	Subpoblación
CD1a ⁻ 3 ⁻ 4 ⁻ 8 ⁻ DR ⁻	Pretimocitos (PT)
CD3 ⁻ 4 ⁻ 8 ⁻ DR ⁻	Timocitos triple negativos (TN)
CD3 ⁻ 4 ⁻ DR ⁻	Timocitos CD3 ⁻ 4 ⁻
CD3 ⁻ 8 ⁻ DR ⁻	Timocitos CD3 ⁻ 8 ⁻
CD3 ⁻ HLA ⁻ DR ⁻	Timocitos corticales (TC)
CD1a ⁻ DR ⁻	Timocitos medulares (TM)

columna de nylon, se filtraron, y se lavaron 2 veces con medio completo. En todos los casos, excepto para la obtención de timocitos corticales, se realizó un paso adicional de centrifugación en gradiente de densidad sobre Ficoll-Hypaque (Lymphoprep) para eliminar células muertas residuales. La viabilidad celular de las preparaciones fue siempre superior al 98%. Su pureza se estudió mediante inmunofluorescencia directa (Apartado 5.1.).

2. PREPARACION DE LINEAS ESTROMALES TIMICAS HUMANAS

2.1. Aislamiento de células estromales tímicas

Para la obtención de células estromales, el timo se fragmentó hasta obtener muestras de aproximadamente 1 mm^3 , descartando los timocitos libres mediante pipeteo vigoroso. Estos fragmentos se incubaron durante 30 minutos a 37°C en una solución enzimática preparada en RPMI 1640, consistente en 2,5 ml de tripsina al 0,3% (Sigma); 2,5 ml de colagenasa al 0,3% (Sigma) y 1 ml de DNasa al 0,1%, dispersando las células cada 5 minutos mediante pipeteo suave. La suspensión celular resultante se lavó en RPMI 1640 (400xg, 15 minutos a 4°C) y se resuspendió en 1 ml de RPMI 1640 con DNasa al 0,1%, incubándose durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se añadieron 5 ml de RPMI 1640, recogiendo alícuotas de 2 ml de la suspensión que se depositaron sobre 3 ml de FCS. Después de 30 minutos de reposo a 4°C se descartó la capa superior, y la capa inferior que contiene la mayoría de las células estromales, se resuspendió tras un lavado (200xg, 5 minutos a 4°C) en 10 ml de medio completo. Finalmente, alícuotas de 1 ml se cultivaron durante 2 días en placas de 12 pocillos (Costar). En este momento la placa se

lavó 2 veces para eliminar las células no adherentes, prolongándose la incubación durante 3 días más.

2.2. Cultivo de células estromales

Las células estromales se cultivaron en placas de 12 pocillos a una concentración inicial de $2,5 \times 10^4$ células/ml en 2 ml de medio completo, renovando 2/3 del medio de cultivo cada 3-5 días. Cuando las células cubrían la totalidad de la superficie de la placa se despegaron y se transfirieron a placas nuevas. La frecuencia de pases varió según la línea utilizada, pero por término medio fue de uno por cada siete días de cultivo. Para despegar las células se lavó la placa con PBS sin calcio ni magnesio y se incubó, durante 5 minutos a temperatura ambiente, con 2 ml de una solución de tripsina 0,15% y EDTA 0,02%, en PBS libre de calcio y magnesio. Las células se recogieron mediante pipeteos suaves, lavando a continuación la placa dos veces más con RPMI 1640. La suspensión resultante se centrifugó ($200 \times g$ 10 minutos a $4^\circ C$) y se resuspendió en medio completo. Tras el conteo de las células, éstas se sembraron en nuevas placas a la concentración antes indicada.

2.3. Caracterización fenotípica

Los estudios inmunohistoquímicos se realizaron sobre células estromales adherentes cultivadas (durante 16-18 horas) en cámaras de vidrio de ocho pocillos (Bokusui Brown, NY, EE.UU.), empleando el sistema Vectastain ABC Kit (Vector Laboratories, CA, EE.UU.). Todas las

incubaciones se realizaron a temperatura ambiente en cámara húmeda. Previamente, las células se fijaron con acetona fría durante 15 minutos y se lavaron con PBS. Tras un paso de bloqueo con suero de caballo, las muestras se incubaron durante 30 minutos con el AcMo correspondiente. Después de un lavado se incubaron primero con anti-Igs de ratón biotiniladas (20 minutos) y posteriormente, tras un nuevo lavado, con avidina-peroxidasa (20 minutos). Los portas se lavaron con PBS y se añadió una solución de DAB (3, 3 diaminobencidina) en PBS con H_2O_2 al 0,02%. La reacción de color se paró lavando con agua durante 2 minutos, y las preparaciones se contrastaron con hematoxilina durante 2 minutos. Para los estudios fenotípicos sobre células no fijadas se prepararon suspensiones celulares mediante tratamiento de los cultivos con PBS-EDTA al 0,02%, y se emplearon técnicas de inmunofluorescencia (Apartado 5.1.).

2.4. Cocultivos de células estromales y timocitos

En los experimentos de interacción los timocitos (4×10^6) se incubaron en 2 ml de medio completo sobre monocapas estromales. Estas últimas se establecieron con antelación cultivando, durante 18-24 horas, 2×10^4 células estromales en placas de 12 pocillos. Los ensayos proliferativos en presencia de células estromales se realizaron mediante el cultivo de los timocitos ($0,5-1 \times 10^5$) sobre monocapas estromales, establecidas sobre placas de 96 pocillos (Costar) (Apartado 3.1.).

2.5. Obtención de sobrenadantes de los cultivos de células estromales

Las células estromales se cultivaron en placas de 6 pocillos (Costar) con medio completo hasta alcanzar un estado de confluencia, en este momento se retiró el medio y tras un lavado con PBS se añadió medio suplementado con FCS al 0,1%, que se mantuvo durante 48 horas. Este sobrenadante "libre de suero" se centrifugó (400xg, 10 minutos a 4°C), se filtró (0,45 µm), se concentró (100x) con una membrana de ultrafiltración PM10 (Amicon, Danvers, MA, EE.UU.) y se almacenó a -40°C hasta su uso.

3. CULTIVOS CELULARES

3.1. Condiciones generales

Todos los cultivos se realizaron en medio RPMI 1640 con Hepes 25 mM, suplementado con un 10% de FCS, penicilina (200 UI/ml) y estreptomícina (200 µg/ml) (Antibióticos Farma, S.A., España) y L-glutamina 2 mM (Flow), utilizando un incubador humidificado a 37°C y atmósfera con un 5% de CO₂.

3.2. Ensayos proliferativos

Los timocitos se cultivaron por triplicado en microplacas de 96 pocillos (0,5-1x10⁵ células/pocillo) con 0,2 ml de medio completo, en presencia de diferentes agentes. La proliferación celular se determinó por incorporación de ³H-timidina (Radiochemical Centre Ltd., Amersham, GB) en el ADN celular, tras un pulso de 18 horas con 1 µCi/pocillo, antes de la finalización del cultivo. Las células se recogieron sobre filtros (Filtermats, Skatron AS, Noruega) utilizando un colector semiautomático (Skatron, EE.UU.). La

radiactividad incorporada se midió por espectrometría de centelleo en un contador Rack-Beta 1212 (LKB, Suecia).

3.3. Aditivos especiales utilizados en los cultivos

- 12, 13 phorbol dibutirato (PBBu₂) (Sigma): se disolvió en dimetilsulfóxido (DMSO) a una concentración de 1 mg/ml y se mantuvo a -40°C hasta su uso. En los cultivos se empleó a una concentración final de 50 ng/ml.
- Interleuquina 2 recombinante humana (rIL-2) (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, RFA): se empleó a una concentración final de 10 UI/ml.
- Afidocolina (Sigma): se disolvió en DMSO a una concentración de 2,5 mg/ml y se empleó en los cultivos a una dilución final 1:1.000.
- Colcemida (Demecolcina) (Gibco, Paisley, Escocia, GB): se empleó a una concentración final de 30 ng/ml.

4. ANTICUERPOS MONOCLONALES

En las Tablas II y III se indican los AcMos utilizados en este trabajo, los antígenos que reconocen y su procedencia.

4.1. Producción y purificación de AcMos

Para producir AcMos se cultivaron hibridomas en medio completo utilizando sistemas de cultivo estacionarios. El sobrenadante de los cultivos se recogió periódicamente (cada 2-4 días) y la concentración de Ac se determinó por ELISA. Para obtener grandes cantidades de AcMos, los

TABLA II. Descripción de los Ac monoclonales utilizados en este trabajo

ANTIGENO	HIBRIDOMA	ESPECIE	ISOTIPO	REFERENCIA
CD1a	NA1/34	ratón	IgG _{2a(K)}	93
CD1b	NU-T2	ratón	IgG _{2a}	94
CD1c	M241	ratón	IgG _{2a}	94
CD2	TS2/18.1	ratón	IgG ₁	95
CD3e	SPvT3b	ratón	IgG _{2a}	96
CD4	HP2/6	ratón	IgG _{2a}	97
CD8	B9.4.2	ratón	IgG _{2b(K)}	98
CD25	MAR108	ratón	IgG ₁	99
CD45RA	111-1C5	ratón	IgG ₁	100
CD45R0	UCHL1	ratón	IgG _{2a(K)}	101
CD58	TS2/9.1(LFA-3)	ratón	IgG ₁	102
HLA A, B, C	W6/32	ratón	IgG _{2a(K)}	103
HLA DR	Q2.70	ratón	IgG ₃	104
TCR β	4WF.5B	ratón	IgG _{2a}	105

TABLA III. Descripción de los Ac monoclonales comerciales utilizados en este trabajo

ANTIGENO	HIBRIDOMA	ESPECIE	ISOTIPO	SUMINISTRADOR
NO CONJUGADOS				
TCR δ	5A6.E9(TcR δ 1)	ratón	IgG1	T Cell Sciences
Citoqueratina	PCK-26	ratón	IgG1	Sigma
Vimentina	VIM-13.2	ratón	IgG1	Sigma
CONJUGADOS CON FLUORESCENCIA (FITC)				
CD2	T11	ratón	IgG1(K)	Coulter
CD3e	UCHL1	ratón	IgG1(k)	Dako
CD4	MT310	ratón	IgG1(K)	Dako
CD8	T8	ratón	IgG1(K)	Coulter
CD14	Mo2	ratón	IgM(K)	Coulter
CD20	B1	ratón	IgG2a(K)	Coulter
CD25	ACT-1	ratón	IgG1(K)	Dako
CD45RA	2H4	ratón	IgG1(K)	Coulter
CD45RO	UCHL1	ratón	IgG2a(K)	Dako
HLA DR	L243	ratón	IgG2a	Becton-Dickinson
CONJUGADOS CON FICOCERITRINA (PE)				
CD3e	UCHL1	ratón	IgG1(k)	Immunotech
CD4	T4	ratón	IgG1(K)	Coulter
CD5	T1	ratón	IgG2a(K)	Coulter
CD8	DK25	ratón	IgG1(K)	Dako
CD34	QB END/10	ratón	IgG1	Serotec
CD45RA	2H4	ratón	IgG1(k)	Coulter
CD56	NKH-1	ratón	IgG1(K)	Coulter

hibridomas correspondientes (10^6 - 10^7) se inocularon intraperitonealmente a ratones isogénicos, preinyectados 7 días con 0,5 ml de pristano. El líquido ascítico recogido se analizó mediante electroforesis en geles de agarosa.

La purificación de los AcMos (presentes en los sobrenadantes de cultivo y en los fluidos ascíticos) empleados en este trabajo, se realizó mediante cromatografía de afinidad, utilizando columnas de 1 ml de proteína A-Sepharosa (Pharmacia, Upsala, Suecia). Para ello, después de un lavado inicial de equilibración con 10 volúmenes de PBS (pH 8), se aplicó la muestra de ascitis o sobrenadante, previamente filtrada ($0,45 \mu\text{m}$). Tras otro paso de lavado se eluyó la proteína adsorbida con tampón glicina 0,1 M; pH 2,5; monitorizando la absorbancia del eluido a 280 nm. El pH de las fracciones de interés se neutralizó con Tris 2M (pH 8), dializándolas a continuación frente a PBS durante 48 horas.

Los AcMos con poca afinidad a proteína A se purificaron mediante cromatografía de intercambio iónico en DEAE-celulosa. Las muestras se equilibraron antes de su aplicación con el buffer inicial (fosfato 10 mM, pH 7,2) mediante diálisis durante 24 horas, o mediante filtración en gel (Sephadex 25). Para la elución se empleó un gradiente de 10 a 200 mM.

La concentración de los AcMos purificados se determinó mediante ELISA y su pureza por electroforesis en geles de agarosa.

4.2. Conjugación de AcMos con isotiocianato de fluoresceína

Los AcMos NA1/34 y W6/32 purificados se dializaron durante 48 horas a 4°C frente a un tampón de marcaje (ácido bórico 0,05 M; NaCl 0,2 M; pH 9,2). La reacción de marcaje se realizó a temperatura ambiente durante 2

horas, añadiendo 20 μ l de una solución de FITC (5 mg/ml) (Eastman, Rochester, NY, EE.UU.) en DMSO, por cada mg de AcMo. Las moléculas de FITC no unidas se eliminaron mediante diálisis frente a Tris-HCl 0,1 M; NaN_3 0,1%; pH 7,4 durante 48 horas.

4.3. Preparación de inmunoabsorbentes mediante el acoplamiento de AcMos a Sepharosa 4B

Los experimentos de inmunoprecipitación se realizaron con inmunoabsorbentes preparados mediante el acoplamiento de los AcMos NA1/34, W6/32, 4WF y SPvT3b (Tabla II) a Sepharosa 4B activada con CNBr (Pharmacia). Los AcMos purificados se dializaron frente a un tampón de acoplamiento (NaOHCO_3 0,1 M; NaCl 0,5 M; pH 8,3) durante 24 horas a 4°C. La Sepharosa 4B se lavó 3 veces con HCl 1 mM (200 ml/gr), posteriormente se añadió la solución de proteínas, en una proporción aproximada de 15 mg/gr de Sepharosa y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación. El porcentaje de acoplamiento estimado mediante lectura espectrofotométrica (A_{280}) osciló entre un 80 y un 90%. Los grupos activos libres se bloquearon mediante incubación durante 2 horas con una solución de glicina 1M, pH 8. Posteriormente, los inmunoabsorbentes se lavaron con 3 ciclos de tampones de diferente pH (acetato 0,1 M; NaCl 0,5 M; pH 4 y Tris 0,1 M; NaCl 0,5 M; pH 8) y se resuspendieron (1:1) en tampón TSA (Tris-HCl 10 mM; NaCl 150 mM; NaN_3 0,02%; pH 7,4).

5. ESTUDIOS DE FLUORESCENCIA

5.1. Estudio de antígenos de superficie celular

El estudio de antígenos de membrana sobre células en suspensión se realizó mediante técnicas de inmunofluorescencia directa (IFD) o indirecta (IFI). En la técnica indirecta $0,5-1 \times 10^6$ células se incubaron con el AcMo correspondiente, en condiciones de saturación, durante 25 minutos a 4°C . Después de 2 lavados se incubaron con un segundo anticuerpo [fracción F(ab')_2] de cabra anti-IgG de ratón conjugado con FITC (Sigma), durante 45 minutos a 4°C . Después de 3 lavados, las células se resuspendieron en 300 μl de PBS suplementado con FCS al 1% y NaN_3 al 0,02%, y se analizaron en un citofluorómetro de flujo (CF). En todos los casos se realizaron controles omitiendo el primer anticuerpo.

En las tinciones directas, generalmente de doble fluorescencia, las células ($0,5-1 \times 10^6$) se incubaron con cantidades apropiadas de AcMos conjugados con FITC y con PE. Después de 3 lavados se resuspendieron en PBS-FCS1% y se analizaron en un CF (Apartado 5.4.).

5.2. Estudio del ciclo celular

Para el análisis del contenido de ADN las células ($1-2 \times 10^6$) se fijaron previamente con una solución de paraformaldehído (PF) al 1% en PBS, durante 1 hora. Después de un lavado se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente en PBS con Triton X-100 al 0,1% (Boehringer Mannheim), RNasa A (250 $\mu\text{g/ml}$) (Sigma) e ioduro de propidio (IP) (5 $\mu\text{g/ml}$) (Sigma), analizándose a continuación en un CF.

5.3. Estudio simultáneo de antígenos de superficie y ciclo celular

Para el estudio combinado de un Ag de membrana y del contenido de ADN, se realizó inicialmente el marcaje de superficie mediante IFI con FITC y, a continuación, tras un paso de fijación durante una hora con PBS-PF1%, las células se permeabilizaron y se trataron con IP (como previamente se indica).

Para el estudio simultáneo de dos antígenos de superficie y contenido de ADN, el marcaje de membrana se realizó mediante IFD, empleando AcMos conjugados con FITC y con PE. Tras el paso de fijación las células se incubaron durante 90 minutos en PBS con Triton X-100 (0,025%), RNasa A (250 $\mu\text{g/ml}$) y 7-Amino-actinomicina D (25 $\mu\text{g/ml}$) (Sigma) y se analizaron en un CF. La 7-AAD es un fluorocromo que se excita a 488 nm, cuya emisión es compatible con las emisiones del FITC y de la PE, utilizando los filtros adecuados (106).

5.4. Análisis citofluorométrico

Los estudios se realizaron en un EPICS Profile (Coulter Electronics, Hialeah, FL, EE.UU.) equipado con un láser de argón (488 nm). Los acotamientos se establecieron según los parámetros de dispersión frontal (Forward light scatter) y de dispersión ortogonal (90° light scatter). Para los estudios con dos (FITC y PE o FITC y IP) o tres fluorocromos (FITC, PE y 7-AAD) se empleó la configuración óptica y la combinación de filtros previamente descrita (106, 107). Teniendo en cuenta que la aglutinación celular puede originar inexactitud en la determinación de los índices de

proliferación, en estudios del contenido de ADN celular (IP ó 7-AAD) se construyeron histogramas dobles con la fluorescencia del ADN (fluorescencia lineal vs señal pico de fluorescencia) a fin de excluir los dobletes presentes en la suspensión celular. Los datos recogidos tras el análisis de las muestras se almacenaron en "List mode" y estudios posteriores para demostrar la correlación entre los diferentes parámetros analizados, fueron realizados mediante el programa de análisis citológico EPICS Elite (versión 2.21) (Coulter Electronics).

6. AISLAMIENTO Y ANALISIS DE PROTEINAS

6.1. Marcaje de proteínas de superficie con ^{125}I

Para el marcaje de proteínas de membrana las células (10^7) se lavaron 3 veces con PBS, pH 7,4 y se marcaron con 1 mCi de ^{125}I Na (Amersham) empleando como reactivo iniciador IODO-BEADS (Pierce, IL, EE.UU.) (108). Tras el lavado y secado de las bolas (2 por marcaje) sobre papel Whatman, se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente en 200 μl de una solución de PBS con 1 mCi de ^{125}I Na. Al finalizar este tiempo se añadieron las células en 200 μl del mismo tampón y se mantuvo la reacción durante 15 minutos. Posteriormente se lavaron las células 3 veces con RPMI 1640.

6.2. Marcaje metabólico

Se empleó como solución de marcaje medio RPMI 1640 carente de metionina y cisteína (Flow), siguiendo el protocolo siguiente: 10^7 células se

lavarón 2 veces en el medio de marcaje y se resuspendieron en 1 ml del mismo medio, suplementado con un 5% de FCS (dializado frente a solución salina), L-glutamina 2 mM, penicilina 200 UI/ml y estreptomicina 200 µg/ml, y se incubaron a 37°C durante 15 minutos. Posteriormente se añadieron 100 µCi de ³⁵S-Met:Cys (Tran³⁵S-label™, ICN Biomedicals, Inc., CA, EE.UU.) y se prolongó la incubación durante 90 minutos a 37°C, con agitación ocasional. Las células se sedimentaron por centrifugación, y se incubaron durante 30 minutos en RPMI 1640 con un 10% de FCS a 37°C, antes de proceder a la lisis celular.

6.3. Solubilización de proteínas celulares

Para la solubilización de proteínas celulares marcadas con ¹²⁵I o con ³⁵S, se emplearon los detergentes no iónicos Triton X-100 ó Triton X-114 (Boehringer Mannheim), respectivamente. Las células marcadas radiactivamente se lavaron dos veces (500xg, 5 minutos a 4°C) con tampón TSA y se resuspendieron en 1 ml de tampón de lisis Tris-HCl 20 mM; NaCl 150 mM; EDTA 2 mM; pH 7,4; Triton X-100 ó Triton X-114 al 1% e inhibidores de proteasas: APMSF 50 µM (Boehringer Mannheim), leupeptina 10 µg/ml (Sigma), iodoacetamida 5 mM (Sigma) y aprotinina 10 µg/ml (Bayer, RFA). Tras incubar durante 30 minutos a 4°C con agitación ocasional, los lisados se centrifugaron a 4°C durante 10 minutos a 10.000xg. En lisados procedentes de marcaje metabólico el sobrenadante obtenido se centrifugó posteriormente durante 30 minutos a 100.000xg (4°C).

El sobrenadante final de los lisados celulares obtenidos con Triton X-114 se dividió en dos alícuotas de 0,5 ml que se depositaron sobre 250 µl del

tampón de lisado, al que se había añadido Triton X-114 (0,5%) y sacarosa (10%), separándose las fases acuosa (A) y detergente (D) tras incubación a 37°C durante 3 minutos. La fase D se obtuvo en el fondo del tubo tras centrifugar a 4.000xg, durante 3 minutos a 20°C.

La fase A se sometió a un nuevo ciclo de extracción tras la adición de 50 µl de Triton X-114 al 10%. Las fases D generadas se mezclaron y resuspendieron en 600 µl de tampón TSA, mientras que la fase A se reconstituyó con 50 µl de Triton X-114 al 10%. Ambas fases se emplearon en los experimentos de inmunoprecipitación.

6.4. Inmunoprecipitación de antígenos radiomarcados

Los sobrenadantes radiomarcados (^{125}I ó ^{35}S) se sometieron a 2 pasos sucesivos de preadsorción durante 2 horas a 4°C, primero con 50µl de una solución 1:1 de proteína A-Sepharosa en tampón TSA, y a continuación con 25 µl de una solución 1:1 de IgG humana (Bayer) unida a Sepharosa 4B en el mismo tampón.

Los sobrenadantes preadsorbidos se dividieron en 2 alícuotas iguales, añadiendo a cada una de ellas 15 µl de una suspensión (1:1) de 4WF ó SPvT3b-Sepharosa, e incubándolas durante 2 horas a 4°C con agitación. Las fracciones no adsorbidas se trataron en idénticas condiciones con W6/32 ó NA1/34-Sepharosa. Los sedimentos se obtuvieron por centrifugación (2.000xg, 30 segundos) lavándose cinco veces:

- 1 ml de TSA; Triton X-100 ó X-114 0,5%; BSA 0,1%; 2 lavados
- 1ml de TSA, 2 lavados
- 1ml de Tris-HCl 20 mM; pH 7,4; 1 lavado

Posteriormente, se añadieron 20-50 μ l de tampón de carga (Tris-HCl 65 mM; pH 6,8; SDS 4%, 2 β -mercaptoetanol 1%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0,01%) sobre los inmunoprecipitados y se incubaron a 100°C durante 5 minutos. Los sobrenadantes se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (12,5%) en presencia de SDS (SDS-PAGE), según el método de Laemmli (109). La detección de los antígenos radiomarcados se realizó mediante autorradiografía con pantalla intensificadora (125 I), o tratamiento fluorográfico (35 S) tras inmersión en PPO-DMSO (110).

7. AISLAMIENTO DE ARNm

Para el aislamiento de ARN mensajero (ARNm) se empleó el sistema QuickPrepMicro (Pharmacia). Las células (5×10^5) se lisaron con una solución que contiene isotiocianato de guanidinio y N-dodecil-sarcosina, y a partir del extracto obtenido se purificó el ARN poli (A)⁺ por afinidad con celulosa-oligo(dT). Tras el lavado con soluciones de salinidad decreciente, el ARNm se eluyó con agua y se purificó mediante precipitación con acetato potásico y etanol absoluto.

8. SINTESIS DE LA PRIMERA CADENA DE ADNc Y AMPLIFICACION DE TRANSCRIPTOS ESPECIFICOS (TCR α Y TCR β) POR PCR

Para la síntesis de una cadena de ADN complementaria del ARNm se empleó la transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina Moloney, utilizando como cebador una cadena de poli(dT) (Sistema First-Strand cDNA Synthesis Kit, Pharmacia).

Como sustrato para efectuar una reacción en cadena de polimerasa (PCR) se emplearon diluciones sucesivas (1:10) de la solución de ARNm/ADNc, y como cebadores específicos los indicados en la Tabla IV (amablemente proporcionados por el Dr. A. Plaza. Clínica Puerta de Hierro). La reacción se realizó en las siguientes condiciones: 1 μ l de la solución ARNm/ADNc, 0,625 unidades de Taq-polimerasa (Promega, Madison, WI, EE.UU.) y 10 pmol de cada cebador fueron incubados en 25 μ l de tampón de PCR (Tris-HCl 10 mM; pH 8,3; KCl 50 mM; MgCl₂ 1,5 mM y dNTPs 0,2 mM) (Promega). Como parámetros de amplificación se utilizaron: un ciclo inicial de desnaturalización (90 segundos a 94°C) y 30 ciclos de 15 segundos a 94°C (desnaturalización); 30 segundos a 60°C (hibridación) y 60 segundos a 72°C (extensión), seguidos por un último periodo de extensión de 7 minutos a 72°C. Los productos de amplificación (β -Actina 1.126 pares de bases (pb), TCR α 101 pb y TCR β 379 pb) se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa y tinción con bromuro de etidio.

Tabla IV. Cebadores específicos

Cebador	Secuencia	Origen/ Referencia
β -Actina _{sense}	5'ATGGATGATGATATCGCCGCG3'	Clontech (111)
β -Actina _{antisense}	5'CTAGAAGCATTTGCGGTGGACGATGGAGGGGCC3'	Clontech (111)
TCR α _{sense} (HCA)	5'CAGCCCAGAAAGTTCCTG3'	Dr. A. Plaza
TCR α _{antisense} (AHCA)	5'ATTCGGAACCCAATCACTG3'	Dr. A. Plaza
TCR β _{sense} (HCB)	5'CGAGGTCGCTGTGTTTG3'	Dr. A. Plaza
TCR β _{antisense} (AHCB)	5'CGAGGTAAAGCCACAGTCTGCTCTA3'	Dr. A. Plaza (112)

1. DIVISION CELULAR EN TIMO HUMANO

1.1. Estudio simultáneo del contenido de ADN y de la expresión de un antígeno de membrana

El análisis del ciclo celular en timocitos humanos de individuos menores de 5 años, mediante tinción del ADN celular con ioduro de propidio (IP), reveló que un $11,5 \pm 1,8\%$ de las células (media de 10 experimentos diferentes) están en división (fases S/G₂/M). Para intentar definir las principales poblaciones en proliferación, se estudió la correlación entre fenotipo y ciclo celular en preparaciones de timocitos totales. Tras el marcaje de diferentes antígenos de superficie (inmunofluorescencia indirecta) las células se fijaron, permeabilizaron y se trataron con IP. En la Figura 1 se muestran los histogramas de doble fluorescencia (contenido de ADN vs expresión de diferentes antígenos de membrana), donde se observa que la mayoría de las células en división expresan las moléculas CD1a, CD4, CD8 y CD45R0, y no expresan CD45RA. Hay que señalar que el método empleado probablemente no permite identificar con precisión las células CD45RA⁺ en fases S/G₂/M, dado que sólo un 3,6% de los timocitos totales, fundamentalmente pretimocitos y algunas células medulares en reposo (113, 114), expresan esta molécula (media de 5 experimentos diferentes).

La expresión de moléculas MHC de clase I (HLA) y de CD3 en timocitos humanos es característicamente trimodal, existiendo células que no expresan los antígenos y otras que los expresan con baja (B) o alta (A) intensidad (66). Para definir con precisión el nivel de expresión de ambas moléculas en las células en división, se establecieron sobre los histogramas de doble

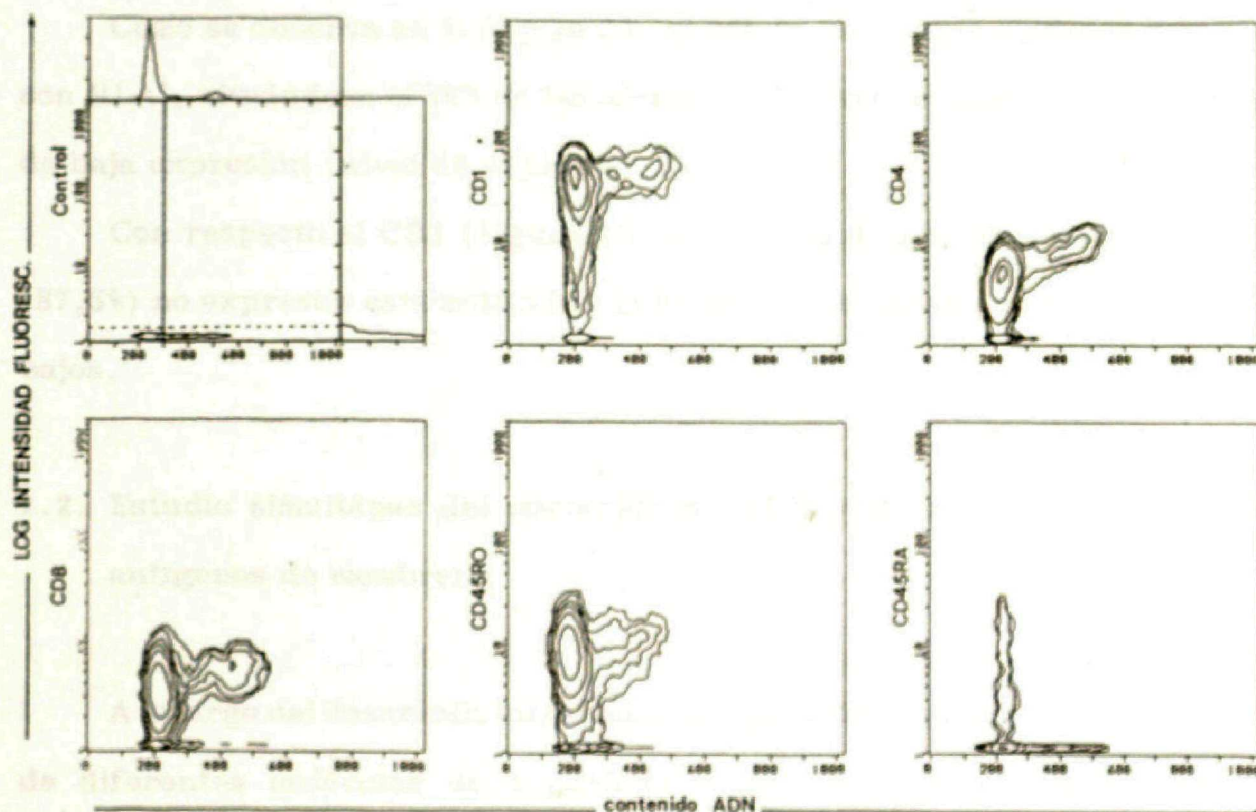


Figura 1. Estudio simultáneo de la expresión de un antígeno de membrana y del contenido de ADN en timocitos totales humanos, tras el marcaje de diferentes moléculas de superficie (CD1a, CD4, CD8, CD45RA y CD45RO) mediante inmunofluorescencia indirecta (FITC) y tratamiento con IP. Los datos se expresan en histogramas de doble fluorescencia: FITC (ordenadas) vs IP (abscisas). La intensidad de fluorescencia del FITC se representa en escala logarítmica y la intensidad del IP en escala lineal. En el control, la línea discontinua representa el límite entre tinción negativa y positiva, y la línea continua separa las células en fases G_0/G_1 y $S/G_2/M$.

fluorescencia (contenido de ADN vs expresión de CD3 ó HLA) ventanas de análisis, generadas a partir del perfil de expresión de cada molécula de membrana, que permitiesen discriminar entre la mitad superior (SUP) e inferior (INF) de las regiones de baja (B) y alta expresión (A).

Como se observa en la Figura 2A, el 94% de las células en fases S/G₂/M son HLA⁺, situándose el 76% de las mismas en la parte superior de la región de baja expresión (nivel de expresión HLA ^{B/SUP}).

Con respecto al CD3 (Figura 2B) la mayoría de las células en división (87,5%) no expresan esta molécula o lo hacen a unos niveles extremadamente bajos.

1.2. Estudio simultáneo del contenido de ADN y de la expresión de dos antígenos de membrana

A lo largo del desarrollo intratímico la expresión y modulación secuencial de diferentes moléculas de superficie origina una gran heterogeneidad fenotípica, lo cual dificulta la interpretación de los datos que relacionan ciclo celular y expresión de antígenos únicos. Por ello, y para definir con mayor exactitud las principales subpoblaciones tímicas en división, se analizó simultáneamente la expresión de parejas de antígenos empleando técnicas de inmunofluorescencia directa (FITC y PE), y el contenido de ADN mediante tratamiento con 7-Amino-actinomicina D (7-AAD) de las células marcadas. A partir de los perfiles del contenido de ADN de la población se establecieron ventanas de acotamiento sobre las células en fases G₀/G₁ ó S/G₂/M, analizando a continuación el fenotipo de las células situadas en cada fase del ciclo.

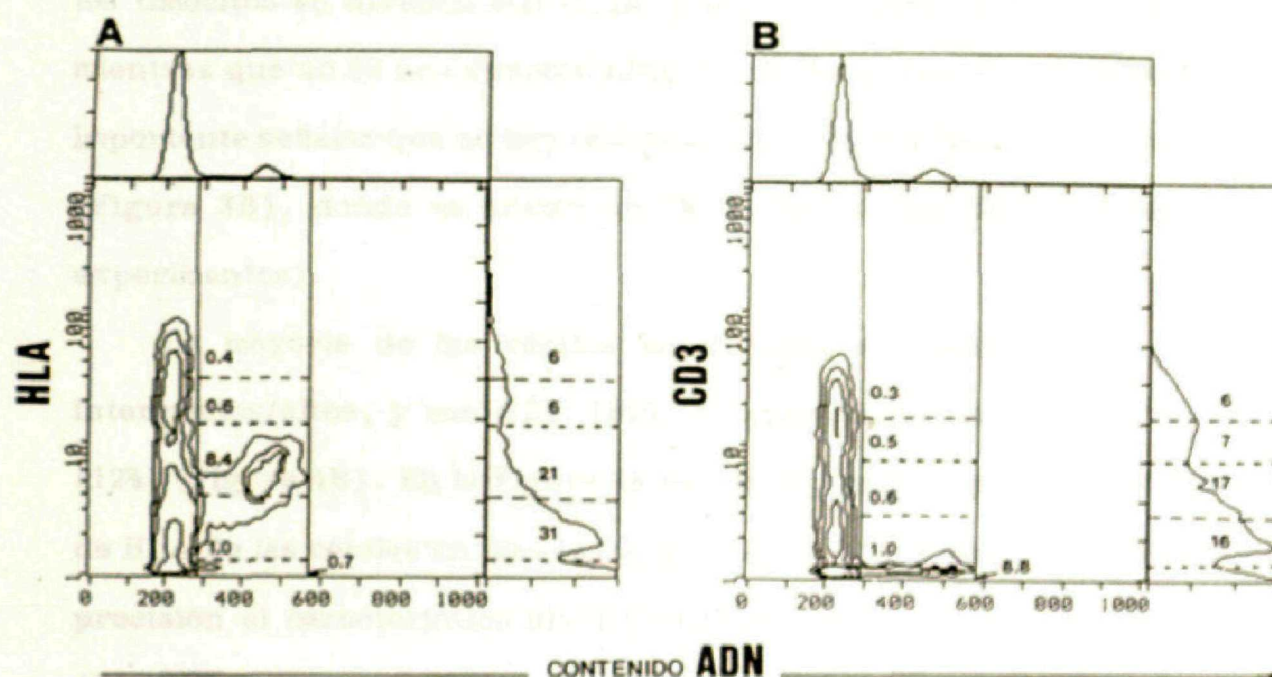


Figura 2. Estudio simultáneo del contenido de ADN (IP) y de la expresión de HLA (A) ó CD3 (B) en timocitos totales humanos mediante inmunofluorescencia indirecta. Los valores numéricos representados sobre la proyección de los perfiles de expresión (FITC) indican el porcentaje de células en cada región. En los histogramas bidimensionales (FITC vs IP) los valores numéricos reflejan el porcentaje de células en división (S/G₂/M) en cada ventana de análisis.

Los timocitos en fases G_0/G_1 muestran un patrón de expresión de los antígenos analizados (Figuras 3A, 4A y C) muy similar al observado en las preparaciones de timocitos totales. En lo que respecta a la expresión de las moléculas CD1a y CD3, se observa que la mayoría de las células en fases $S/G_2/M$ (Figura 3B) expresan CD1a (94%) y no expresan CD3 (85%). Un 9% de los timocitos en división son $CD1a^+$ y expresan niveles muy bajos de CD3, mientras que un 6% no expresan ninguna de las dos moléculas ($CD1a^-3^-$). Es importante señalar que no hay células en división dentro de la región $CD1a^+3^+$ (Figura 3B), donde se sitúan un 7% de las células tímicas (media de 10 experimentos).

La mayoría de las células en división expresan HLA con niveles intermedios/altos, y son $CD3^-$ (84%) o expresan niveles muy bajos de CD3 (12%) (Figura 4B). En la Figura 4E se superponen los perfiles de expresión de HLA de las células en fase G_0/G_1 y $S/G_2/M$, lo que permite identificar con precisión el característico nivel de expresión de los timocitos en división ($HLA^{B/SUP}$).

Las moléculas CD4 y CD8 son expresadas simultáneamente por la mayoría de los timocitos (78%). Sin embargo, solamente un 65% de las células en fase $S/G_2/M$ coexpresan ambas moléculas. Un porcentaje importante de células en división (25%) son $CD4^+8^-$, y un 10% no expresan ninguna de estas moléculas ($CD4^-8^-$) (Figura 4D). Es importante reseñar que las células $CD4^+8^+$ en división expresan la molécula CD4 de forma homogénea, con un pico único de alta intensidad, mientras que en las células positivas simples la expresión es mucho más heterogénea (Figura 4F). Es igualmente destacable la existencia de un porcentaje variable (6%) de células $CD4^+$ en división que expresan niveles bajos de CD8 ($CD4^+8^B$) (Figura 4D).

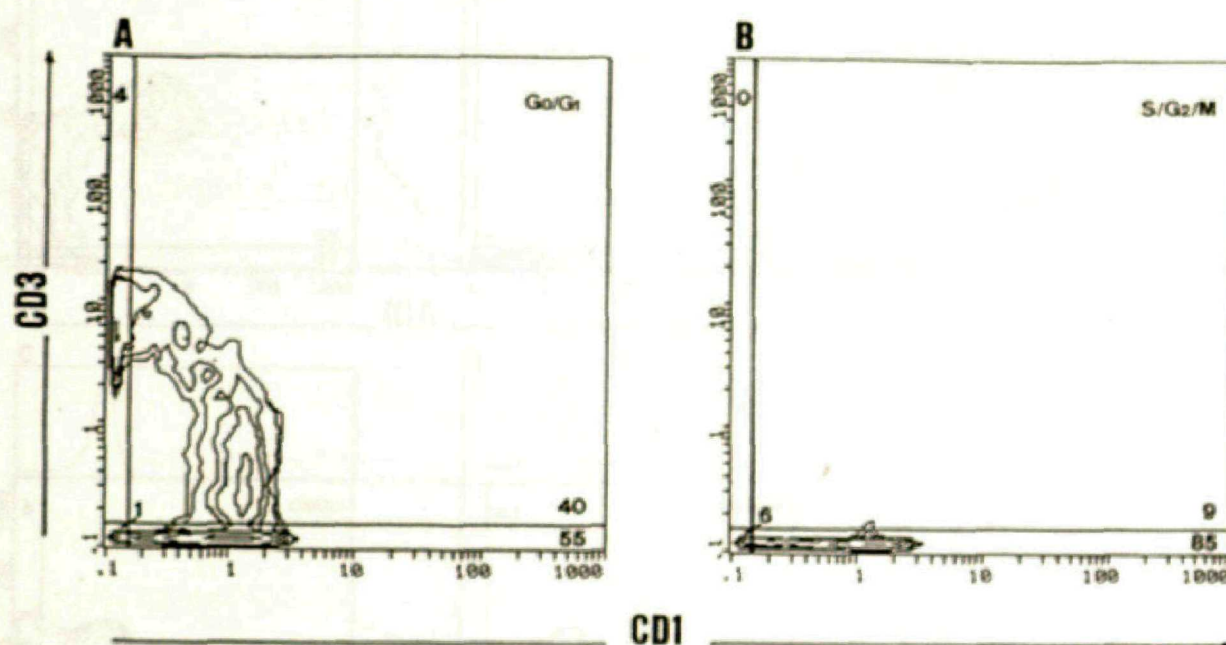


Figura 3. Estudio simultáneo de la expresión de dos antígenos de membrana y del contenido de ADN en timocitos totales humanos tratados con anti-CD1a-FITC, anti-CD3-PE y 7-AAD. Sobre los perfiles de ADN (7-AAD) se establecieron ventanas de acotamiento, analizando el fenotipo (FITC vs PE) de las células en fases G_0/G_1 (A) y $S/G_2/M$ (B). Los valores numéricos indican el porcentaje de células en cada cuadrante.

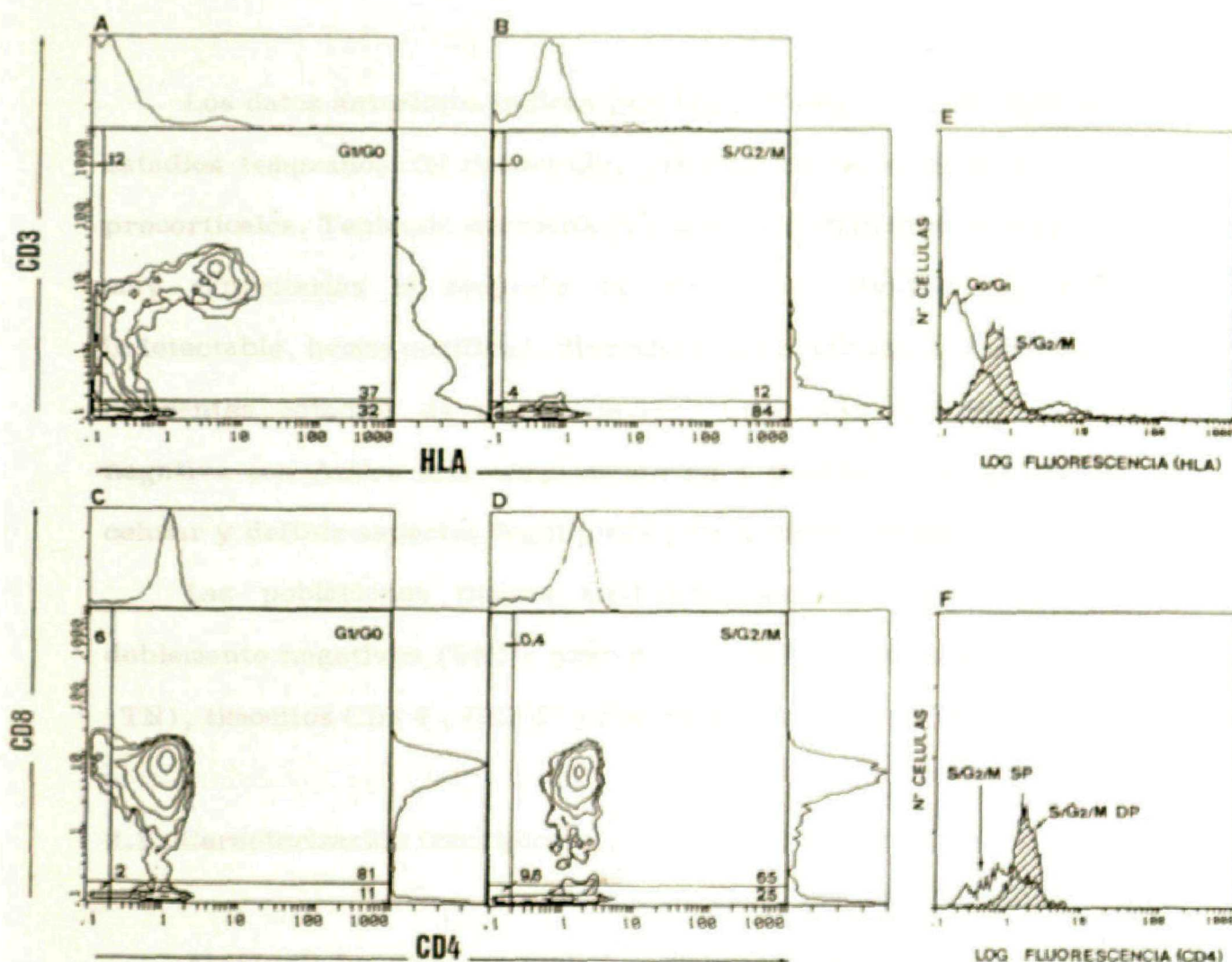


Figura 4. Estudio simultáneo de la expresión de dos antígenos de membrana y del contenido de ADN en timocitos totales humanos tratados con anti-HLA-FITC/anti-CD3-PE (A y B) o anti-CD4-FITC/anti-CD8-PE (C y D) más 7-AAD. Sobre los perfiles de ADN (7-AAD) se establecieron ventanas de acotamiento, analizando el fenotipo (FITC vs PE) de las células en fases G_0/G_1 (A y C) y $S/G_2/M$ (B y D). Los valores numéricos indican el porcentaje de células en cada cuadrante. E: superposición de los perfiles de expresión de HLA de las células en fase G_0/G_1 y $S/G_2/M$ (rayado). F: superposición de los perfiles de expresión de CD4 de las células $CD4^+8^-$ y $CD4^+8^+$ (rayado) en fases $S/G_2/M$.

2. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE SUBPOBLACIONES TIMICAS INMADURAS

Los datos anteriores indican que la proliferación intratímica ocurre en estadios tempranos del desarrollo, principalmente en células corticales y precorticales. Teniendo en cuenta que la contribución de algunas poblaciones muy minoritarias al conjunto de células en división puede resultar indetectable, hemos purificado diversas subpoblaciones tímicas inmaduras en diferentes estadios de diferenciación, utilizando métodos de selección negativa con AcMos más complemento para determinar el estado del ciclo celular y definir aspectos fenotípicos y funcionales de las mismas.

Las poblaciones tímicas analizadas son descritas como timocitos doblemente negativos (DN) o pretimocitos (PT), timocitos triple negativos (TN), timocitos $CD3^+4^-$, $CD3^+8^-$ y timocitos corticales ($CD3^+HLA^-$) (Tabla I).

2.1. Caracterización fenotípica

El estudio fenotípico se realizó mediante técnicas de inmunofluorescencia directa. En todos los casos la contaminación residual por células que presentaban los marcadores de selección fue menor del 3%.

2.1.1. Pretimocitos

Los precursores linfoides más tempranos se obtuvieron por eliminación selectiva de las células que expresaban las moléculas CD1a, CD3, CD4, CD8 y moléculas MHC de clase II (DR). La población obtenida expresa

mayoritariamente CD2 (90%) y HLA con alta intensidad (HLA^A) (97%), y en menor proporción los antígenos CD45RA (60%), CD34 (30%), CD5 (30%), CD45RO (18%) y CD25 (2%) (Figuras 5B y 6A-B). Es importante señalar que en las preparaciones obtenidas se observa siempre una proporción variable (3-6%) de células CD56⁺ (Figura 13).

2.1.2. Timocitos triple negativos

Los timocitos TN se seleccionaron como células $CD3^-4^-8^-DR^-$. El estudio fenotípico (Figuras 5C y 6A-C) indica que la población obtenida es relativamente homogénea, existiendo escasas variaciones fenotípicas entre las distintas muestras estudiadas.

La curva de expresión de la molécula CD1a presenta un patrón trimodal, que corresponde a células que no expresan el marcador (44%), y dos poblaciones que expresan niveles intermedios (21%) o altos (35%). La tinción con anti-HLA muestra dos poblaciones, una mayoritaria (52%) HLA^A y otra menor (45%) con niveles de expresión intermedios/altos ($HLA^{B/SUP}$). Las células CD45RA⁺ constituyen el 35% y las CD45RO⁺ el 55% de la preparación de timocitos $CD3^-4^-8^-$. Del resto de los marcadores estudiados se expresan con niveles significativos CD2 (92%) y CD5 (65%).

2.1.3. Timocitos $CD3^-8^-$

Las suspensiones de células $CD3^-8^-$ que se obtuvieron por eliminación selectiva de los antígenos CD3, CD8 y DR, constituyen preparaciones homogéneas y numéricamente significativas, cuyo rendimiento durante los

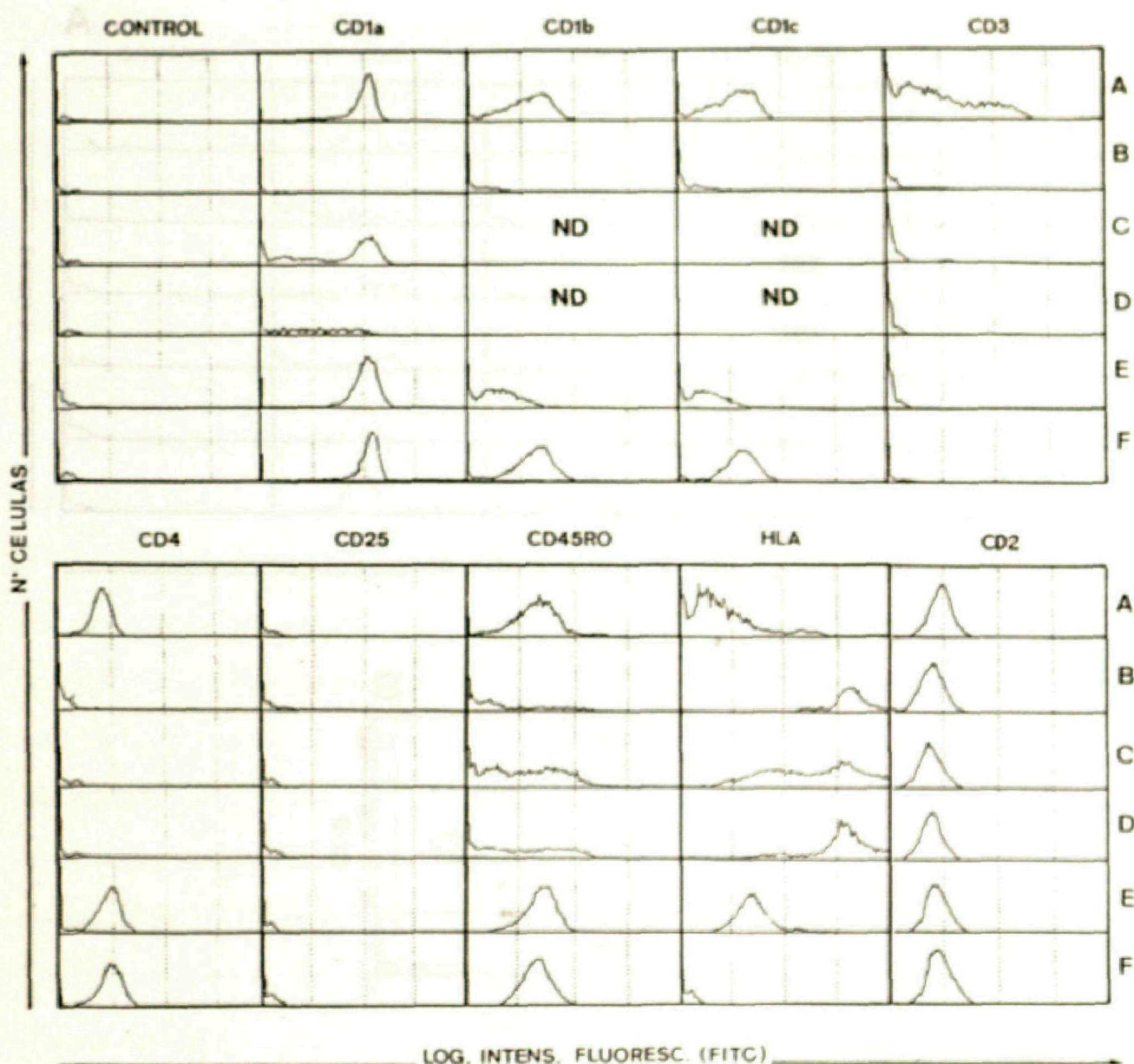


Figura 5. Análisis fenotípico de timocitos totales (A), pretimocitos (CD1a⁻CD3⁻CD4⁻CD8⁻) (B), timocitos TN (CD3⁻CD4⁻CD8⁻) (C), CD3⁻CD4⁻ (D), CD3⁻CD8⁻ (E) y CD3⁻HLA⁻ (F). Los resultados obtenidos tras tratamiento con AcMos conjugados con FITC se expresan en histogramas, donde las ordenadas representan el número de células y las abscisas la intensidad de fluorescencia en escala logarítmica.

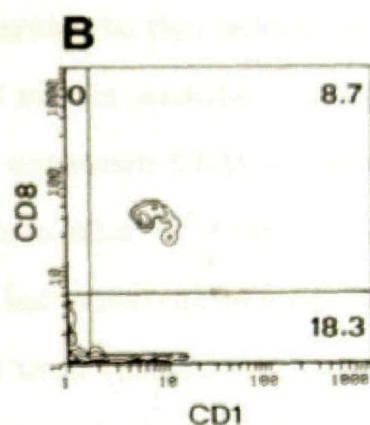
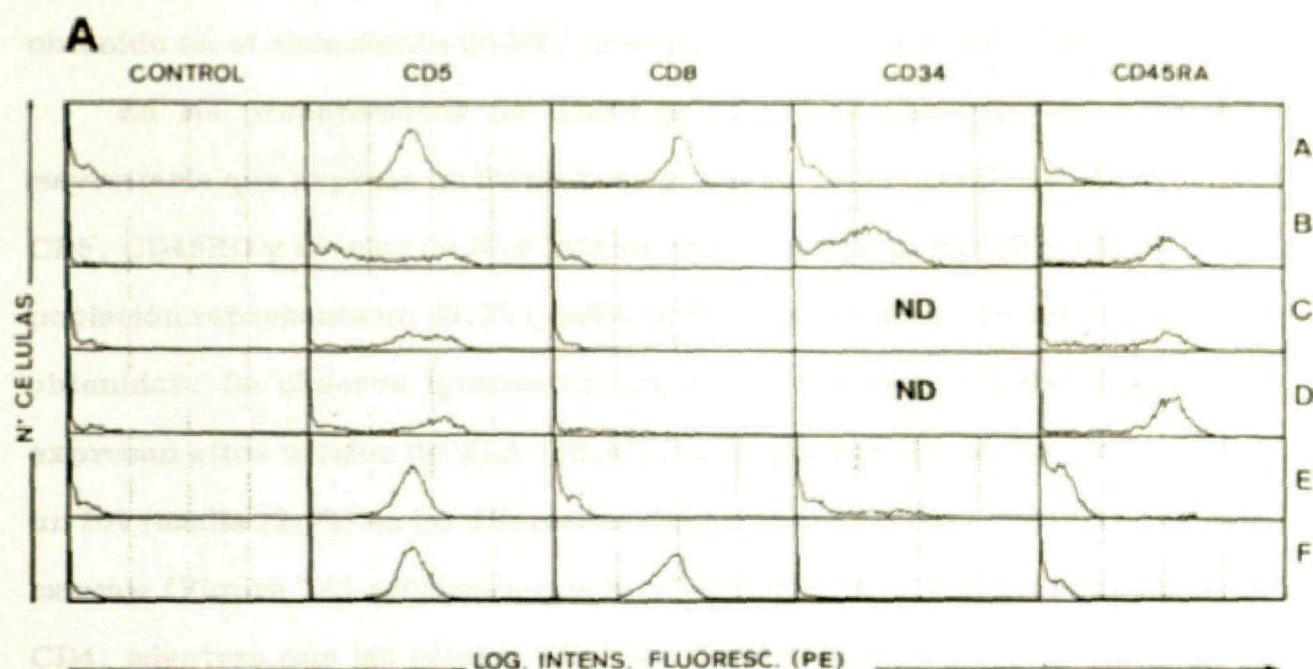


Figura 6. A: Análisis fenotípico de timocitos totales (A), pretimocitos ($CD1a^-3^+4^-8^-$) (B), timocitos TN ($CD3^+4^-8^-$) (C), $CD3^+4^-$ (D), $CD3^+8^-$ (E), y $CD3^+HLA^-$ (F). Los resultados obtenidos tras tratamiento con AcMos conjugados con PE se expresan en histogramas, donde las ordenadas representan el número de células y las abscisas la intensidad de fluorescencia en escala logarítmica. **B:** Estudio de la expresión de las moléculas CD1a y CD8 en timocitos $CD3^+4^-$ tras tinción por inmunofluorescencia directa (anti-CD1a-FITC y anti-CD8-PE). Los valores numéricos indican el porcentaje de células en cada cuadrante.

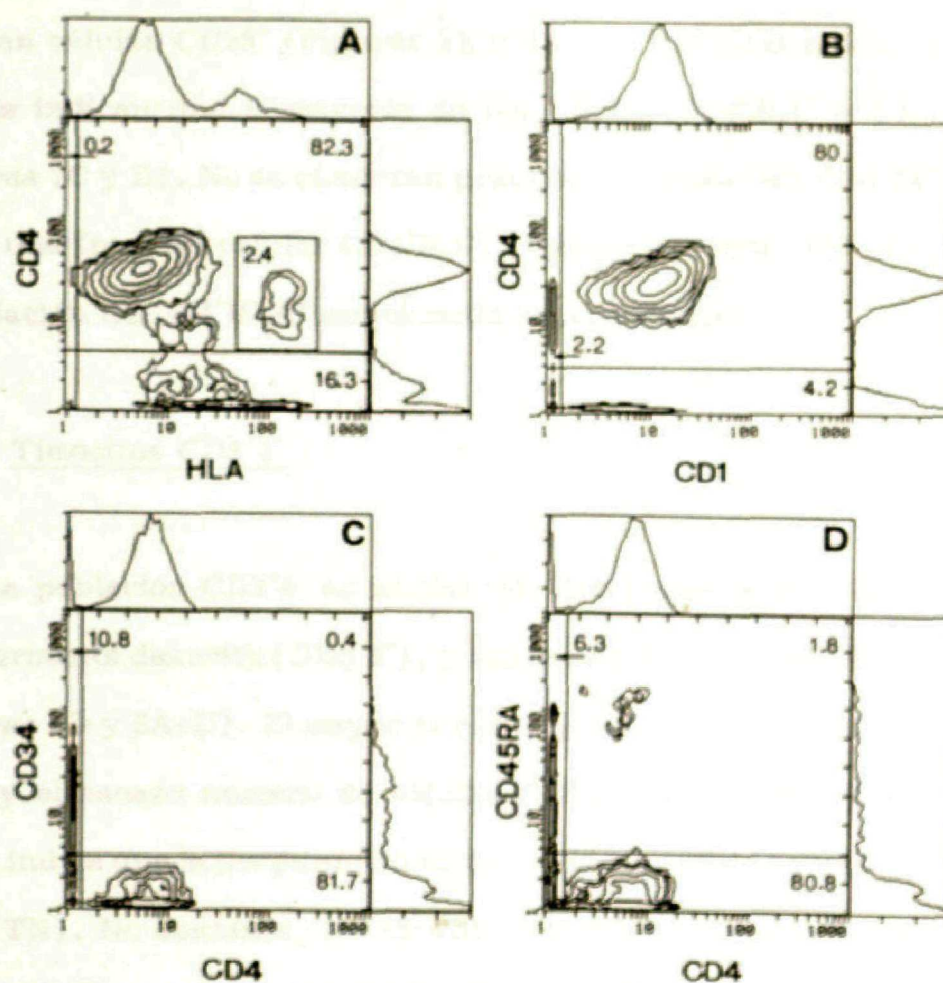


Figura 7. Análisis fenotípico de timocitos CD3⁺8⁻ tratados con anti-HLA-FITC/anti-CD4-PE (A), anti-CD1a-FITC/anti-CD4-PE (B), anti-CD4-FITC/anti-CD34-PE (C), y anti-CD4-FITC/anti-CD45RA-PE (D). Los valores numéricos indican el porcentaje de células en cada cuadrante.

(Figura 7B).

Los timocitos $CD3^+8^-$ expresan niveles apreciables de $CD1b$ (54%) y $CD1c$ (49%), siendo mínima la expresión de $CD45RA$ (6%) y $CD34$ (5%). No se detectan células $CD25^+$ (Figuras 5E y 6A-E). Estudios adicionales de doble marcaje indican que la mayoría de las células $CD45RA^+$ y $CD34^+$ son $CD4^+$ (Figuras 7C y D). No se observan prácticamente células $CD4^+34^+$ (0,4%) pero existe una fracción celular $CD4^+RA^+$, cuya proporción (2%) es similar a la de la población $CD1a^+4^+HLA^A$ mencionada anteriormente.

2.1.4. Timocitos $CD3^+4^-$

La población $CD3^+4^-$ es mucho más heterogénea fenotípicamente que la anteriormente descrita ($CD3^+8^-$), y contiene solamente un 10% de células $CD8^+$ (Figuras 5D y 6A-D). El mayor porcentaje de células $CD45RA^+$ (60%) y HLA^A (70%) y el escaso número de células $CD1a^+$ (30%), $CD5^+$ (38%) y $CD45RO^+$ (44%), indica que la preparación está muy enriquecida en precursores tímicos (PT y TN). No obstante, los estudios de doble marcaje demuestran que las células $CD8^+$ expresan altos niveles de $CD1a$ (Figura 6B), lo que descarta que representen una población precursora.

2.1.5. Timocitos corticales

Los timocitos corticales, obtenidos por eliminación selectiva de las moléculas $CD3$, HLA y DR , representan la población tímica predominante. Constituyen una población homogénea que expresa mayoritariamente las moléculas $CD1a$ (99%), $CD1b$ (86%), $CD1c$ (84%), $CD2$ (99%), $CD4$ (99%), $CD5$

proporciones de células con fase S/G₂/M y en células
prelimocitos totales.

2.3. Estudio comparativo de la población de timocitos totales y de subpoblaciones purificadas

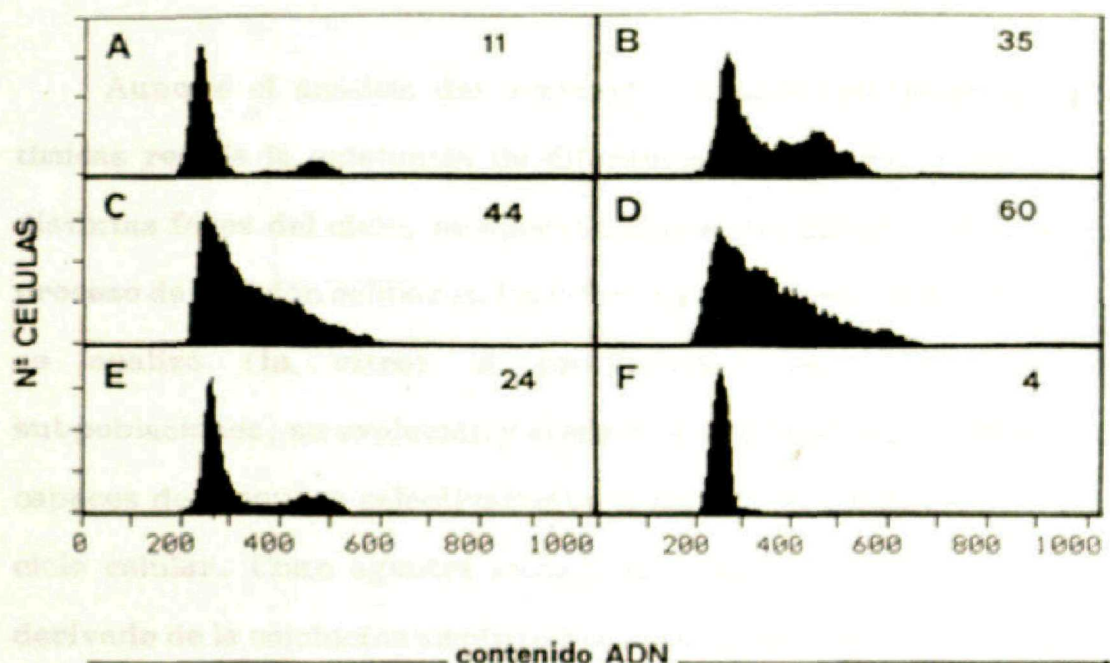


Figura 8. Análisis del contenido de ADN de timocitos totales (A), pretimocitos (CD1a⁻3⁻4⁻8⁻) (B), timocitos TN (CD3⁻4⁻8⁻) (C), CD3⁻8⁻ (D), CD3⁻HLA⁻ (E), y CD1a⁻ (F), tras tinción con IP. En cada histograma (eje y: número de células, eje x: intensidad de fluorescencia en escala lineal) se indica el porcentaje de células en fases S/G₂/M. Se muestra un experimento representativo de 8 realizados en subpoblaciones purificadas, y de 10 en timocitos totales.

preparaciones de células medulares contienen un número variable de pretimocitos contaminantes.

2.3. Estudio comparativo de la proliferación espontánea en timocitos CD3⁺8⁻ y en timocitos corticales

Aunque el análisis del contenido de ADN celular en subpoblaciones tímicas refleja la existencia de diferencias en la proporción de células en distintas fases del ciclo, no aporta información directa sobre la cinética del proceso de división celular en los diferentes compartimentos tímicos. Por ello, se analizó (*in vitro*) la proliferación espontánea de diferentes subpoblaciones, su evolución y el efecto sobre la misma de diferentes agentes capaces de bloquear selectivamente a las células en diferentes estadios del ciclo celular. Como agentes antimitóticos se utilizaron la colcemida (CM), derivado de la colchicina ampliamente usado para inducir bloqueo en metafase (G_2/M), y la afidocolina (APh), inhibidor de la ADN polimerasa α para inducir bloqueo en G_1/S (116, 117).

El estudio se realizó en timocitos CD3⁺8⁻ y en timocitos corticales (CD3⁺HLA⁺), que presentan proporciones relativamente elevadas de células en fases S y G_2/M , respectivamente (Figura 8). Para ello, se incubaron 10^5 células en microplacas de 96 pocillos con medio completo sin aditivos y en presencia de APh o CM, determinando la incorporación de ³H-timidina a las 18, 40 y 70 horas del inicio del cultivo, tras un pulso de 18 horas en presencia del precursor radiactivo.

Como se observa en la Figura 9, a las 18 horas de cultivo los timocitos CD3⁺8⁻ presentan una tasa de proliferación espontánea 5 veces mayor que la

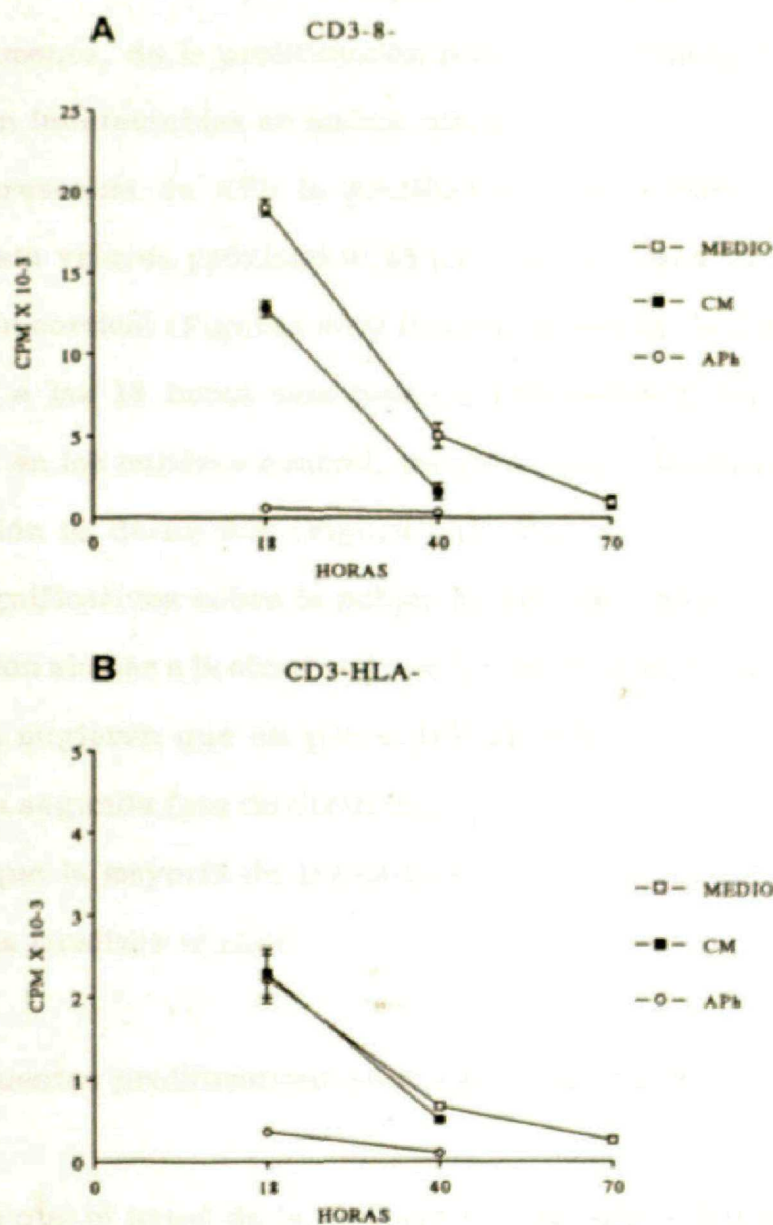


Figura 9. Incorporación de ^3H -timidina por timocitos $\text{CD3}^+\text{8}^-$ (A) y $\text{CD3}^+\text{HLA}^-$ (B) cultivados en medio sin aditivos y en presencia de 30 ng/ml de colcemida (CM) ó 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de afidocolina (APh), a las 18, 40 y 70 horas del inicio del cultivo (tras un pulso de 18 horas en presencia del precursor radiactivo).

de los timocitos $CD3^+HLA^-$. A las 40 horas de cultivo la tasa de proliferación de la población $CD3^+8^-$ y de la población cortical es un 26% y un 30%, respectivamente, de la proliferación inicial (18 horas), y a las 70 horas los valores son indetectables en ambos casos.

En presencia de APh la proliferación se reduce desde el inicio del cultivo hasta valores próximos al 5% para la población $CD3^+8^-$, y al 15% para la población cortical (Figuras 9A y B). En presencia de CM las células $CD3^+8^-$ presentan a las 18 horas una tasa de proliferación un 30% menor que la observada en los cultivos control, mientras que a las 40 horas el porcentaje de inhibición es de un 60% (Figura 9A). Por el contrario, la CM no ejerce efectos significativos sobre la población cortical, que presenta una tasa de proliferación similar a la observada en los cultivos control (Figura 9B). Estos resultados sugieren que un porcentaje significativo de las células $CD3^+8^-$, inician una segunda fase de división (G_1') inmediatamente finalizado el ciclo, mientras que la mayoría de las células corticales permanecen en estado de reposo tras finalizar el ciclo.

2.4. Respuestas proliferativas en subpoblaciones tímicas

Dado que el papel de la IL-2 sobre la proliferación y diferenciación en estadios tempranos del desarrollo intratímico es controvertido (118), y que la activación de la PKC induce la proliferación de los pretímocitos a través del sistema IL-2/receptor de IL-2 (IL-2R) (115), en el presente trabajo hemos analizado las respuestas proliferativas inducidas, en diferentes subpoblaciones tímicas, por la IL-2 y a través de la activación de la PKC, mediante el uso de ésteres de phorbol.

2.4.1. Respuestas proliferativas inducidas por la IL-2

La adición de IL-2 (10 UI/ml) induce la proliferación de los pretimocitos, alcanzando la máxima respuesta durante el sexto día de cultivo. A partir de este momento la respuesta proliferativa disminuye gradualmente (Figura 10A). No obstante la adición de dosis suplementarias de IL-2 (en el sexto día de cultivo) incrementa la respuesta de forma exponencial. En ausencia de IL-2 la viabilidad (Figura 10B) disminuye progresivamente, y a los 9 días del inicio del cultivo la recuperación celular es de un 25%. En presencia de IL-2 el número de células aumenta progresivamente y a los 6 días de cultivo, coincidiendo con el punto de máxima proliferación, se ha duplicado el número inicial. A partir de este momento la viabilidad disminuye de forma rápida y progresiva.

Como se observa en la Figura 11, el estudio comparativo de diferentes subpoblaciones precorticales y corticales, demuestra que la proliferación inducida por la IL-2 tras 6 días de cultivo, es máxima en pretimocitos disminuyendo de forma gradual en las poblaciones situadas en estadios más avanzados, desde un punto de vista madurativo. La proliferación es mínima en la subpoblación CD3⁺8⁻ e indetectable en los timocitos corticales. La población CD3⁺4⁻ muestra una importante respuesta proliferativa a la IL-2, lo cual confirma la presencia de un elevado número de células inmaduras en la preparación (Apartado 2.1.).

2.4.2. Respuesta proliferativa inducida por ésteres de phorbol

Los ésteres de phorbol originan una activación directa y persistente de

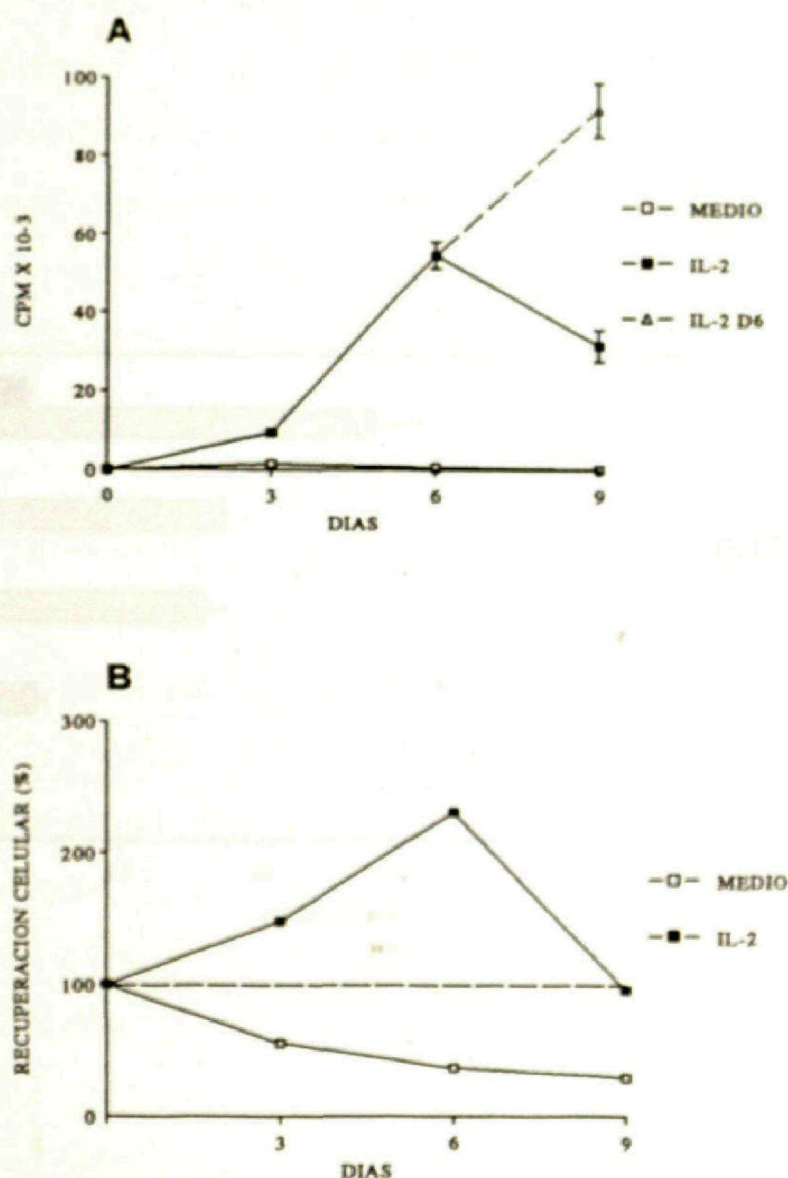


Figura 10. A: Respuesta proliferativa ($\text{cpm} \times 10^{-3}$) de pretimocitos ($\text{CD1a}^+ \text{3}^+ \text{4}^- \text{8}^-$). Las células (10^5) se cultivaron en medio sin aditivos y en presencia de IL-2 (10 UI/ml). En algunos experimentos se añadieron cantidades suplementarias de IL-2 (10 UI/ml) a día 6. La incorporación de ^3H -timidina se determinó a los 3, 6 y 9 días del inicio del cultivo, tras un pulso de 18 horas. Se muestra un experimento representativo de cuatro realizados. **B:** Recuperación celular (%) de pretimocitos cultivados a una concentración de 2×10^6 células/ml en medio sin aditivos y con 10 UI/ml de IL-2. El conteo y análisis de la viabilidad celular se realizó por exclusión con azul tripán a los tiempos indicados.

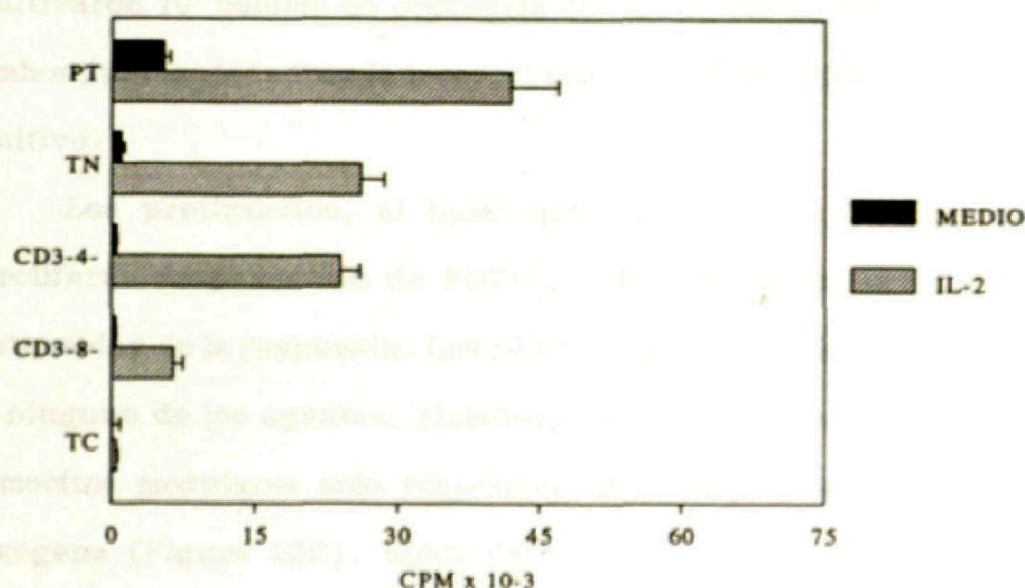


Figura 11. Incorporación de ^3H -timidina por pretimocitos ($\text{CD1a}^-\text{3}^-\text{4}^-\text{8}^-$), timocitos TN ($\text{CD3}^-\text{4}^-\text{8}^-$), $\text{CD3}^-\text{4}^-$, $\text{CD3}^-\text{8}^-$ y $\text{CD3}^-\text{HLA}^-$ (10^5), cultivados durante 6 días en medio sin aditivos y en presencia de IL-2 (10 UI/ml). Los resultados mostrados son la media de 3 experimentos \pm DE.

la PKC, mimetizando la situación fisiológica inducida tras la activación específica de los linfocitos T. Entre los distintos tipos existentes, el phorbol-dibutirato (PDBu₂) se considera el más específico dada su menor capacidad lipofílica (119).

En nuestro trabajo hemos estudiado el efecto de la adición de PDBu₂ a cultivos de diferentes subpoblaciones inmaduras, valorando los fenómenos de proliferación inducida y su relación con el sistema IL-2/IL-2R. Para ello se cultivaron 10⁵ células en presencia de PDBu₂ (50 ng/ml), IL-2 (10 UI/ml) o ambos, determinándose la incorporación de ³H-timidina después de 3 días de cultivo.

Los pretimocitos, al igual que los linfocitos T (Figuras 12A y E) proliferan en presencia de PDBu₂, y la adición de IL-2 no incrementa la intensidad de la respuesta. Las células corticales (Figura 12C) no responden a ninguno de los agentes, aisladamente o en combinación, mientras que los timocitos medulares sólo responden al PDBu₂ si se añade al cultivo IL-2 exógena (Figura 12D). Estos datos confirman los resultados de estudios previos realizados en nuestro laboratorio (115).

La población precortical CD3⁻8⁻ no responde al PDBu₂ ni a la IL-2 aisladamente, pero muestra una importante respuesta proliferativa en presencia de ambos agentes, similar a la respuesta de los timocitos medulares (CD1a⁻DR⁻) (Figura 12B).

3. VARIACIONES FENOTÍPICAS DE LAS SUBPOBLACIONES TIMICAS

PRECORTICALES CULTIVADAS IN VITRO

Los fenómenos de proliferación espontánea e inducida descritos

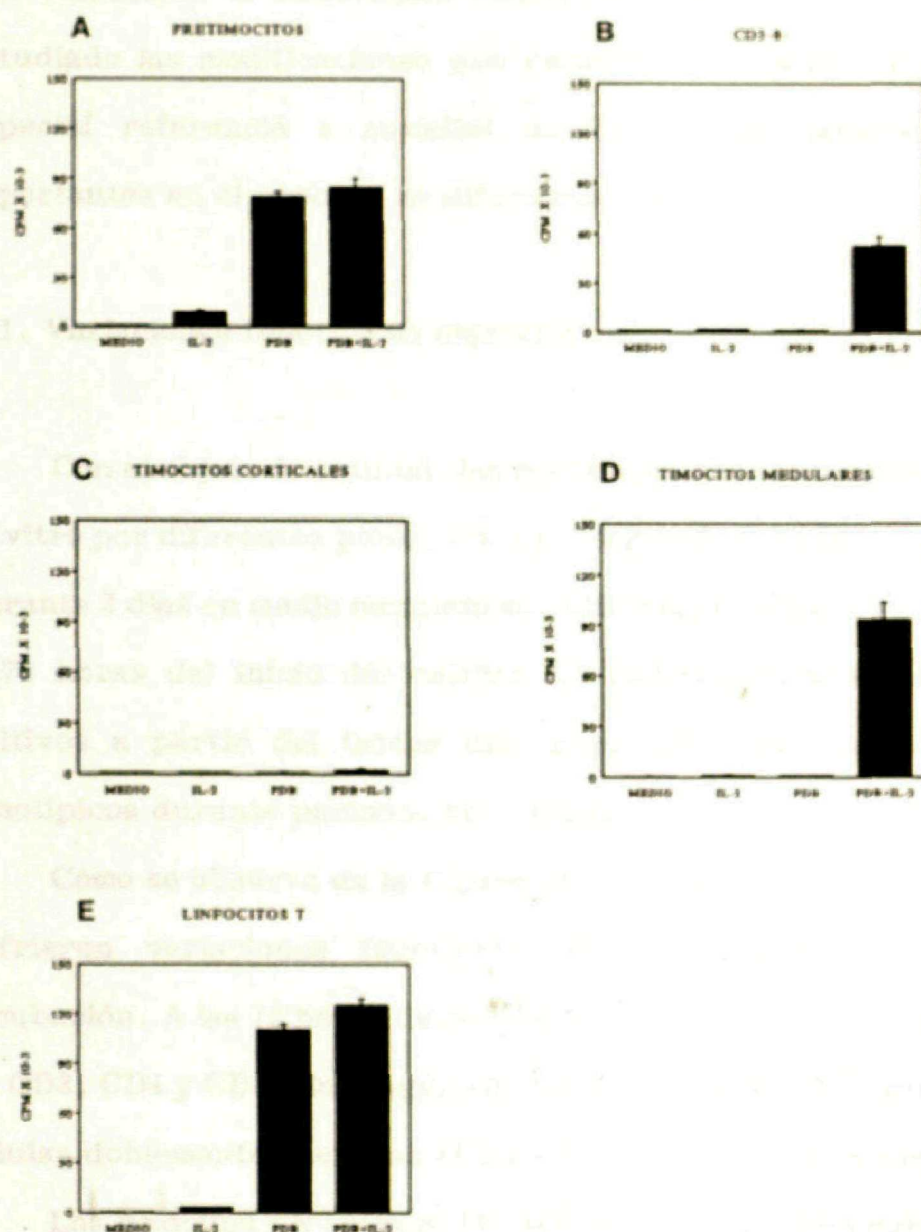


Figura 12. Incorporación de ^3H -timidina por pretimocitos ($\text{CD1a}^{\text{+}}\text{3}^{\text{+}}\text{4}^{\text{+}}\text{8}^{\text{+}}$) (A), timocitos $\text{CD3}^{\text{+}}\text{8}^{\text{+}}$ (B), $\text{CD3}^{\text{+}}\text{HLA}^{\text{+}}$ (C), $\text{CD1a}^{\text{+}}$ (D), y linfocitos T (E) (10^5), cultivados durante 3 días en presencia de IL-2 (10 UI/ml), PDBu_2 (50 ng/ml) o una combinación de ambos. Los resultados mostrados son la media de 5 experimentos \pm DE.

anteriormente, deben interpretarse en relación a las variaciones fenotípicas que conforman la maduración funcional de los timocitos. Por ello, hemos estudiado las modificaciones que experimentan estas subpoblaciones, con especial referencia a aquellas moléculas que permiten definir pasos importantes en el proceso de diferenciación.

3.1. Variaciones fenotípicas espontáneas

Con el objeto de estudiar las modificaciones fenotípicas experimentadas *in vitro* por diferentes poblaciones precorticales, se incubaron 2×10^6 células durante 3 días en medio completo sin aditivos, analizando su fenotipo a las 24 y 72 horas del inicio del cultivo. El limitado rendimiento celular de los cultivos a partir del tercer día, imposibilitó la realización de estudios fenotípicos durante períodos más largos.

Como se observa en la Figura 13, los pretimocitos ($CD1a^{-}3^{-}4^{-}8^{-}DR^{-}$) no sufrieron variaciones fenotípicas durante las primeras 24 horas de incubación. A las 72 horas de cultivo se detectó la expresión de niveles bajos de CD3, CD4 y CD8. En ninguno de los experimentos realizados se detectaron células doblemente positivas ($CD4^{+}8^{+}$), ni se observó la expresión de CD1a.

Los timocitos TN (Figura 14) expresan durante las primeras 24 horas de cultivo cantidades bajas de CD3 (4%), CD4 (12%) y CD8 (4%). Es interesante reseñar que la molécula CD3 se expresa en las células con altos niveles de CD1a. A los 3 días de cultivo se observan pocas modificaciones fenotípicas adicionales, fundamentalmente un aumento en el nivel de expresión de las moléculas ya mencionadas, y una pérdida progresiva de CD1a y HLA. En algunos experimentos se detectó, a las 72 horas de cultivo, la aparición de

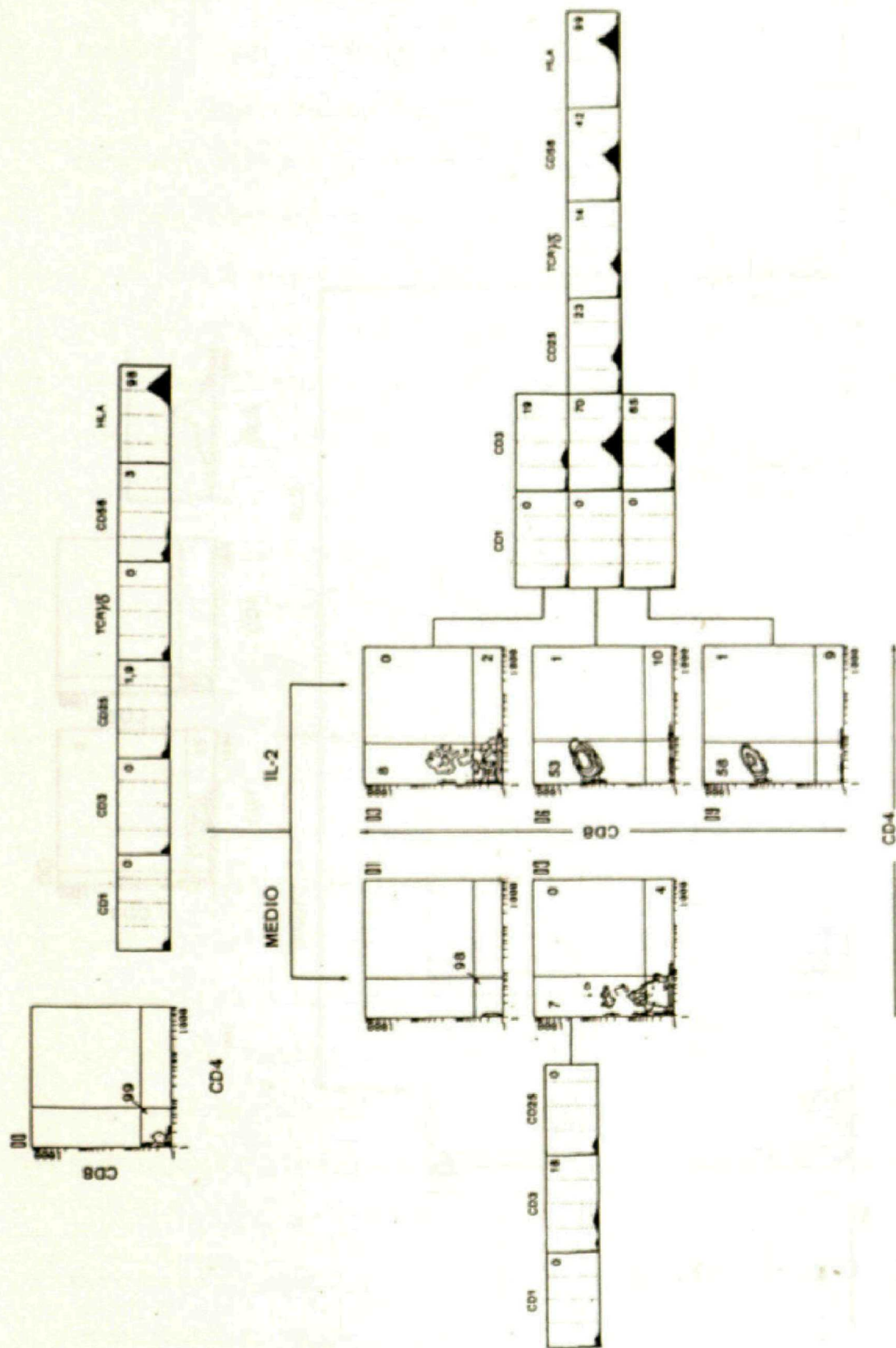


Figura 13. Cambios fenotípicos experimentados por prelinfocitos (CD1a⁺ 3'4'8") cultivados a una concentración de 2×10^6 células/ml en medio sin aditivos y en presencia de 10 UI/ml de IL-2. Las células se recogieron en los tiempos indicados y se estudió la expresión de diversos antígenos de superficie por inmunofluorescencia directa. Los valores numéricos indican el porcentaje de células positivas para cada marcador (histogramas sencillos), y el porcentaje de células en cada cuadrante (histogramas bidimensionales). Se muestra un experimento representativo de 4 realizados.

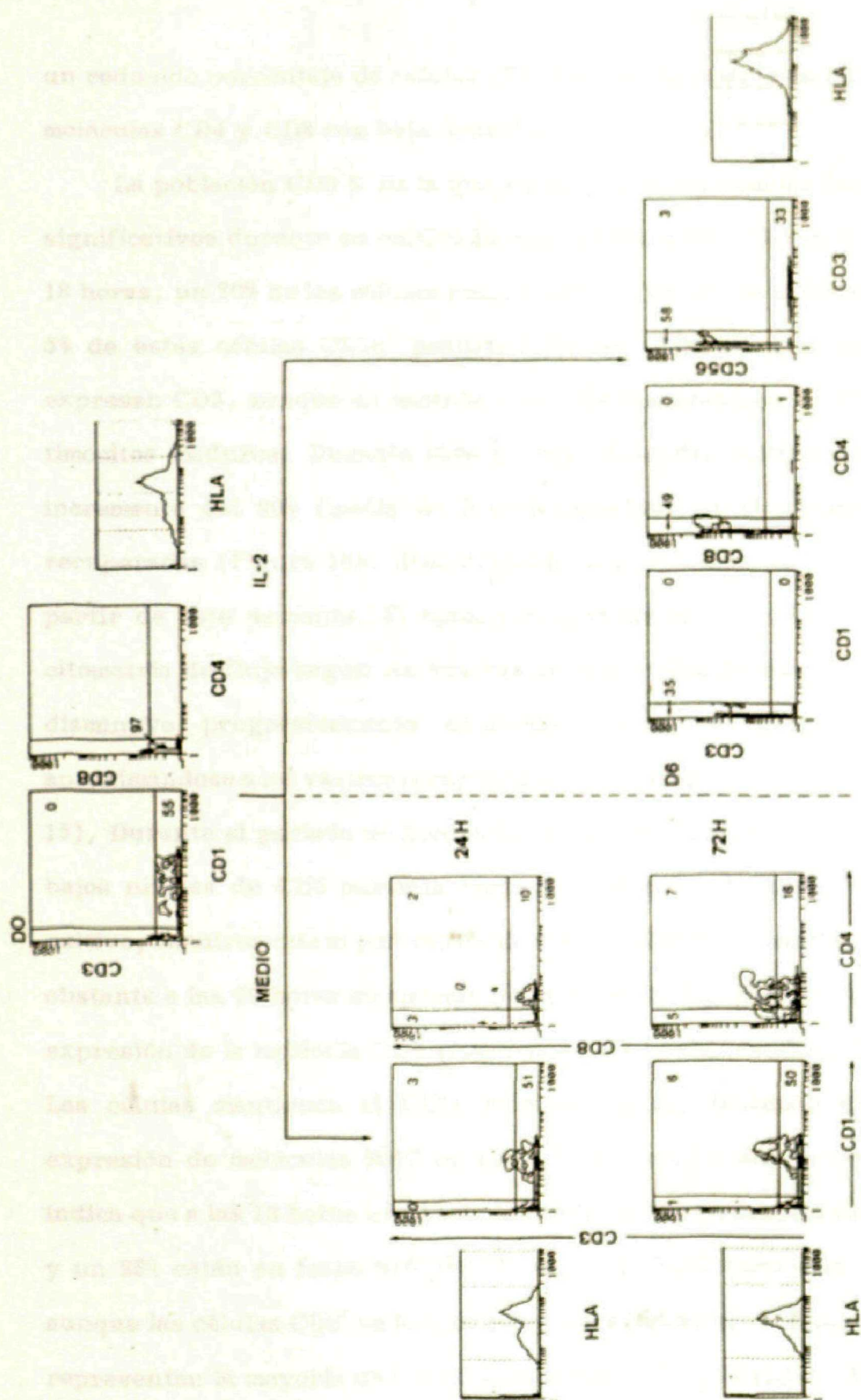


Figura 14. Cambios fenotípicos experimentados por timocitos TN ($CD3^+4^-8^-$) cultivados a una concentración de 2×10^6 células/ml en medio sin aditivos y en presencia de 10 UI/ml de IL-2. Las células se recogieron en los tiempos indicados y se estudió la expresión de diversos antígenos de superficie por inmunofluorescencia directa. Los valores numéricos indican el porcentaje de células en cada cuadrante. Se muestra un experimento representativo de 4 realizados.

un reducido porcentaje de células (7%) que expresaban simultáneamente las moléculas CD4 y CD8 con baja densidad (Figura 14).

La población CD3⁺8⁺ es la que experimenta los cambios fenotípicos más significativos durante su cultivo *in vitro* (Figura 15). Durante las primeras 18 horas, un 70% de las células recuperadas expresan la molécula CD8, y un 5% de estas células CD1a⁺ positivas dobles (CD4⁺8⁺) generadas *in vitro* expresan CD3, aunque en cantidades mucho menores que las observadas en timocitos maduros. Durante esta primera fase del cultivo se observa un incremento del 20% (media de 5 experimentos) en el número de células recuperadas (Figura 16), disminuyendo la proporción de células viables a partir de este momento. El tamaño celular de la población, estimado por citometría de flujo según los valores de dispersión frontal (LFS), también disminuye progresivamente conforme avanza el tiempo de cultivo, aproximándose a los valores característicos de los timocitos corticales (Figura 15). Durante el periodo de incubación el porcentaje de células que expresa bajos niveles de CD3 aumenta hasta un 15% a las 40 horas del inicio del cultivo, mientras que el porcentaje de células CD4⁺8⁺ se mantiene estable. No obstante a las 40 horas se aprecia un incremento significativo en el nivel de expresión de la molécula CD8 (con respecto a lo observado a las 18 horas). Las células mantienen el CD1a y muestran un descenso gradual en la expresión de moléculas MHC de clase I. El estudio del contenido de ADN indica que a las 18 horas un 75% de las células están en fase de reposo (G_0/G_1) y un 25% están en fases S/ G_2 /M (Figura 15). Es interesante destacar que aunque las células CD8⁺ se localizan fundamentalmente en fases G_0/G_1 (50%), representan la mayoría de las células en fases S/ G_2 /M (20%). A las 40 horas del inicio del cultivo prácticamente todas las células están en fase G_0/G_1 . En

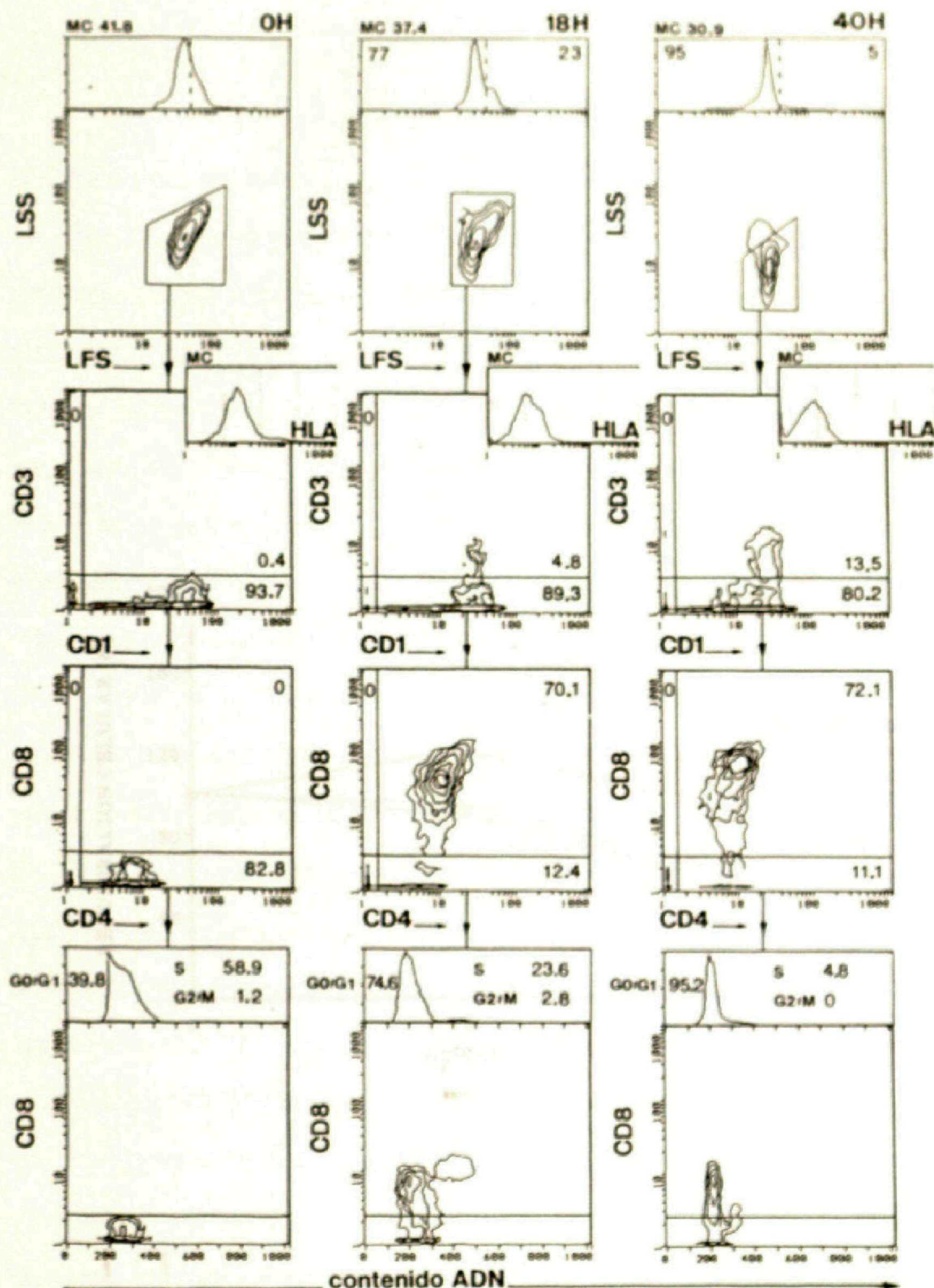


Figura 15. Estudio del tamaño y complejidad celular (LFS vs LSS), expresión de moléculas de superficie y contenido de ADN de timocitos CD3⁺8⁻, cultivados a una concentración de 2×10^6 células/ml en medio sin aditivos. Las células se recogieron a los tiempos señalados, estudiando por CF los parámetros antes indicados tras inmunofluorescencia directa y tratamiento con IP. Los valores numéricos indican el porcentaje de células positivas para cada marcador (histogramas sencillos) y el porcentaje de células en cada cuadrante (histogramas bidimensionales). También se indica (HLA y LFS) el valor del canal medio de fluorescencia (MC) y el porcentaje de células en las diferentes fases del ciclo celular. Se muestra un experimento representativo de 8 realizados.

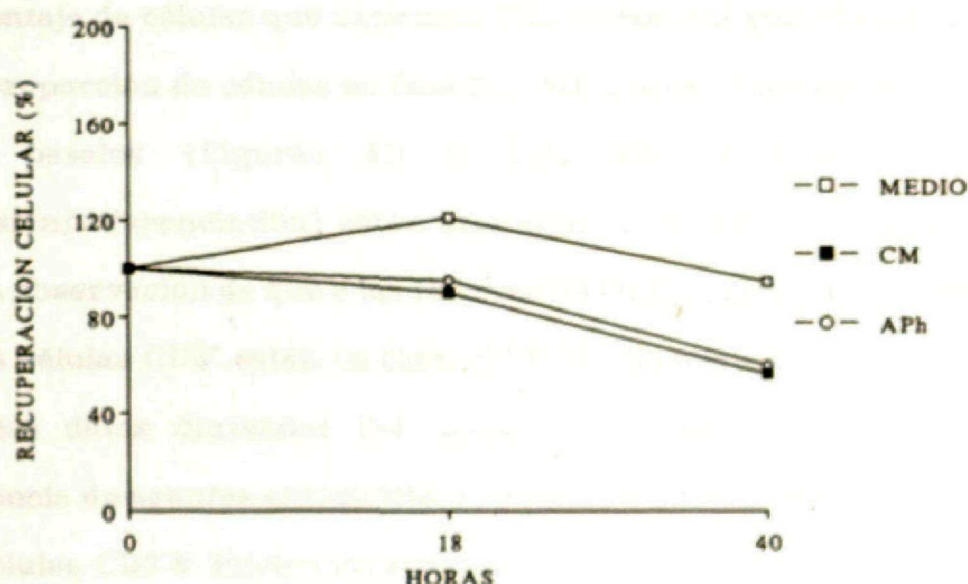


Figura 16. Recuperación celular (%) de timocitos $CD3^+8^-$ cultivados a una concentración de 2×10^6 células/ml, en medio sin aditivos y en presencia de 30 ng/ml de colcemida (CM) ó 2,5 μ g/ml de afidocolina (APh). El conteo y análisis de la viabilidad celular se realizó por exclusión con azul tripán a los tiempos indicados.

el estudio realizado a las 72 horas no se observan modificaciones adicionales.

El proceso de conversión fenotípica espontánea que experimentan los timocitos $CD3^+8^-$ ($CD3^+4^+8^- \rightarrow CD3^+4^+8^+$) indica que esta población precortical en división, representa un estadio transicional en proceso de diferenciación hacia el estadio cortical. En este sentido la convergencia de ambos fenómenos en el estadio $CD3^+8^-$ ofrece la oportunidad única de estudiar las posibles relaciones entre ambos procesos. La correlación que existe entre el porcentaje de células que expresan CD8 durante el periodo de cultivo (70%), y la proporción de células en fase S (60%) que se observan en los perfiles de ADN basales (Figuras 8D y 15), sugiere que ambos procesos (división/diferenciación) están asociados, lo que viene apoyado igualmente por la observación de que a las 18 horas de cultivo un porcentaje significativo de las células $CD8^+$ están en fases S/G₂/M. No obstante, teniendo en cuenta que los datos derivados del estudio de la proliferación espontánea en presencia de agentes antimitóticos, sugieren que una proporción variable de las células $CD3^+8^-$ inician un segundo ciclo de división dentro del periodo de incubación inicial (18 horas) (Apartado 2.3. y Figura 9A), estos resultados no nos permiten determinar con exactitud si la secuencia de expresión antigénica es un evento postmitótico o bien está asociada al proceso de división celular. Para estudiar este aspecto se incubaron 2×10^6 células en presencia de agentes inhibidores específicos (APh ó CM), analizando su fenotipo y el estado del ciclo celular en relación con la expresión de la molécula CD8, que constituye el marcador más característico de los procesos de maduración en este estadio de diferenciación intratímico. El estudio se realizó únicamente a las 18 horas de incubación, debido a que en presencia de ambos agentes antimitóticos la recuperación celular disminuye de forma

significativa con respecto a los cultivos control (sobre todo a partir de las 18 horas de cultivo) (Figura 16).

Como se observa en la Figura 17, el porcentaje de células en fases G_0/G_1 se reduce de un 75% a un 15-20% en presencia de ambos agentes, situándose la mayoría de las células en fases S y G_2/M (26% y 53% respectivamente) en los cultivos con CM, y en fase S (85%) en los cultivos con APh.

Es importante destacar que a pesar del bloqueo que ambos agentes inducen selectivamente sobre diferentes fases del ciclo celular, ninguno de ellos interfiere el proceso de conversión fenotípica que experimentan los timocitos $CD3^+8^-$ (Figuras 15 y 17). En este sentido, el estudio simultáneo del contenido de ADN y de la expresión de CD8 demuestra que las células bloqueadas en fases S ó G_2/M expresan altos niveles de CD8 (Figura 17), lo cual confirma que ambos procesos (expresión antigénica y división celular) están asociados en este estadio del desarrollo intratímico.

El análisis del tamaño celular de la población y su evolución durante el periodo de cultivo, demuestra que existe una buena correlación entre este parámetro (LFS) y el estadio del ciclo celular (concordancia entre el porcentaje de células con altos valores de LFS y el porcentaje de células en fases S/ G_2/M) (Figura 15). La inhibición de la síntesis de ADN condiciona que la población mantenga a las 18 horas de incubación unos valores de LFS similares a los basales, mientras que el bloqueo en G_2/M origina la aparición de una población mayoritaria con altos valores de LFS (Figura 17). En este sentido, el acotamiento diferencial realizado en función del tamaño y la complejidad celular, indica que la mayoría de los timocitos con valores altos de LFS son células $CD4^+$ en fases S y G_2/M que expresan CD8 (Figura 17).

Es interesante destacar que a pesar del bloqueo, en los cultivos

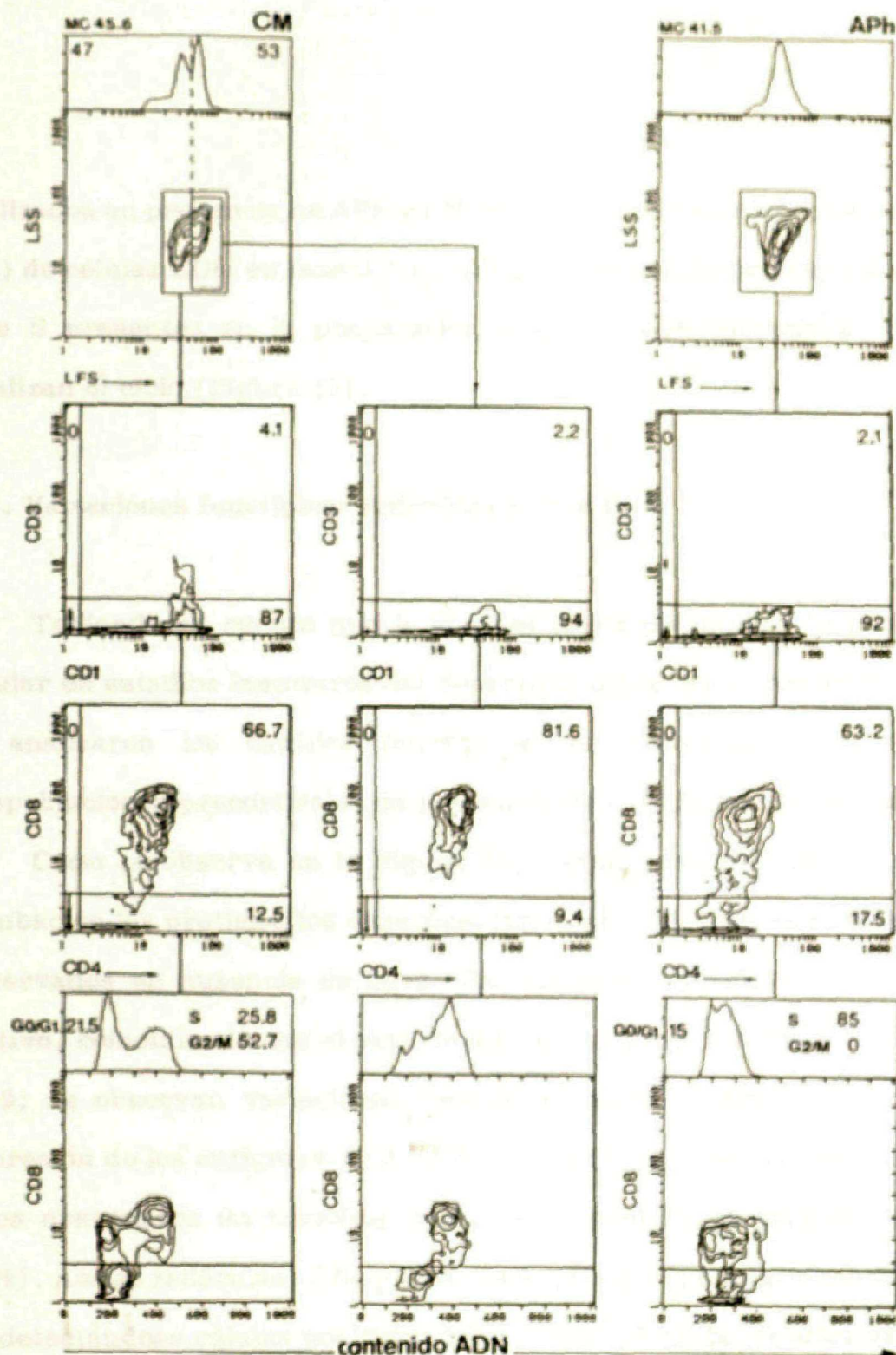


Figura 17. Estudio del tamaño y complejidad celular (LFS vs LSS), expresión de moléculas de superficie y contenido de ADN de timocitos $CD3^+8^-$, cultivados a una concentración de 2×10^6 células/ml en presencia de 30 ng/ml de colcemida (CM) ó 2,5 μ g/ml de afidocolina (APh). Las células se recogieron a las 18 horas, estudiando por CF los parámetros antes indicados tras inmunofluorescencia directa y tratamiento con IP. Los valores numéricos indican el porcentaje de células en cada cuadrante (histogramas bidimensionales). También se indica (LFS) el valor del canal medio de fluorescencia (MC) y el porcentaje de células en las diferentes fases del ciclo celular. Se muestra un experimento representativo de 4 realizados.

realizados en presencia de APh y CM se observa un reducido porcentaje (15-20%) de células CD8⁺ en fase G₀/G₁, que probablemente derivan de células en fase S presentes en la preparación original, que escapan al bloqueo y finalizan el ciclo (Figura 17).

3.2. Variaciones fenotípicas inducidas por la IL-2

Teniendo en cuenta que la IL-2 es capaz de inducir la proliferación celular en estadios inmaduros del desarrollo intratímico (Apartado 2.4.1.), se analizaron los cambios fenotípicos experimentados por diferentes subpoblaciones precorticales en presencia de este factor de crecimiento.

Como se observa en la Figura 13, durante las primeras 72 horas de incubación los pretimocitos experimentan cambios fenotípicos similares a los observados en ausencia de IL-2. Sin embargo, durante el sexto día de cultivo, coincidiendo con el periodo de máxima proliferación inducida por la IL-2, se observan variaciones fenotípicas significativas reflejadas en la expresión de los antígenos CD3 (70%) y CD8 (50%), con niveles comparables a los observados en timocitos maduros, y cantidades moderadas de CD4 (10%). Ambas moléculas, CD4 y CD8, se expresan en poblaciones diferentes, no detectándose células positivas dobles. Un 25% de las células expresan la cadena α del receptor de la IL-2 (CD25). Es importante destacar que en estas condiciones de cultivo se observa un porcentaje importante de células CD56⁺ (40%) y TCR γ/δ ⁺ (15%). En el estudio fenotípico realizado a los 9 días del inicio del cultivo no se apreciaron variaciones con respecto a día 6.

La IL-2 no indujo variaciones fenotípicas adicionales en los cultivos de timocitos TN y de timocitos CD3⁺8⁺, con respecto a lo observado en ausencia

de la misma durante las primeras horas de cultivo (72 y 40 horas respectivamente). A los 6 días predomina en ambos cultivos (Figuras 14 y 18) una población CD1a⁺HLA^A, que expresa CD3 (30%) y CD8 (45%) y menores niveles de CD4, similar a la observada en los cultivos de pretimocitos en presencia de IL-2. Es notorio, en ambos casos, la existencia de una población importante de células CD56⁺ (60-70%).

4. INTERACCION DE SUBPOBLACIONES TIMICAS CON COMPONENTES ESTROMALES

4.1. Aislamiento y caracterización de una línea celular derivada del estroma tímico

Aunque el microambiente tímico desempeña un papel crucial en la generación de células T inmunocompetentes, la contribución de las células estromales en el complejo proceso de diferenciación de los linfocitos T, no es suficientemente conocida. Para intentar profundizar en el significado de las interacciones entre las células del estroma tímico y las células linfoides a lo largo de su desarrollo madurativo, se aislaron previamente células estromales humanas utilizando técnicas de tratamiento enzimático. De las líneas obtenidas, una de ellas (PG/85) fue caracterizada fenotípicamente y empleada en ensayos de interacción *in vitro* con diferentes subpoblaciones de timocitos, a fin de determinar su relación con los procesos de maduración de IL-2. Las células se cultivaron en presencia de IL-2, lo que permitió la selección de una población adherente. Los valores de adherencia fueron de 10-20 células por campo de visión. Los estudios con microscopía óptica, en cultivos subconfluentes de la línea PG/85, muestran una población adherente de morfología heterogénea con

Los estudios con microscopía óptica, en cultivos subconfluentes de la línea PG/85, muestran una población adherente de morfología heterogénea con

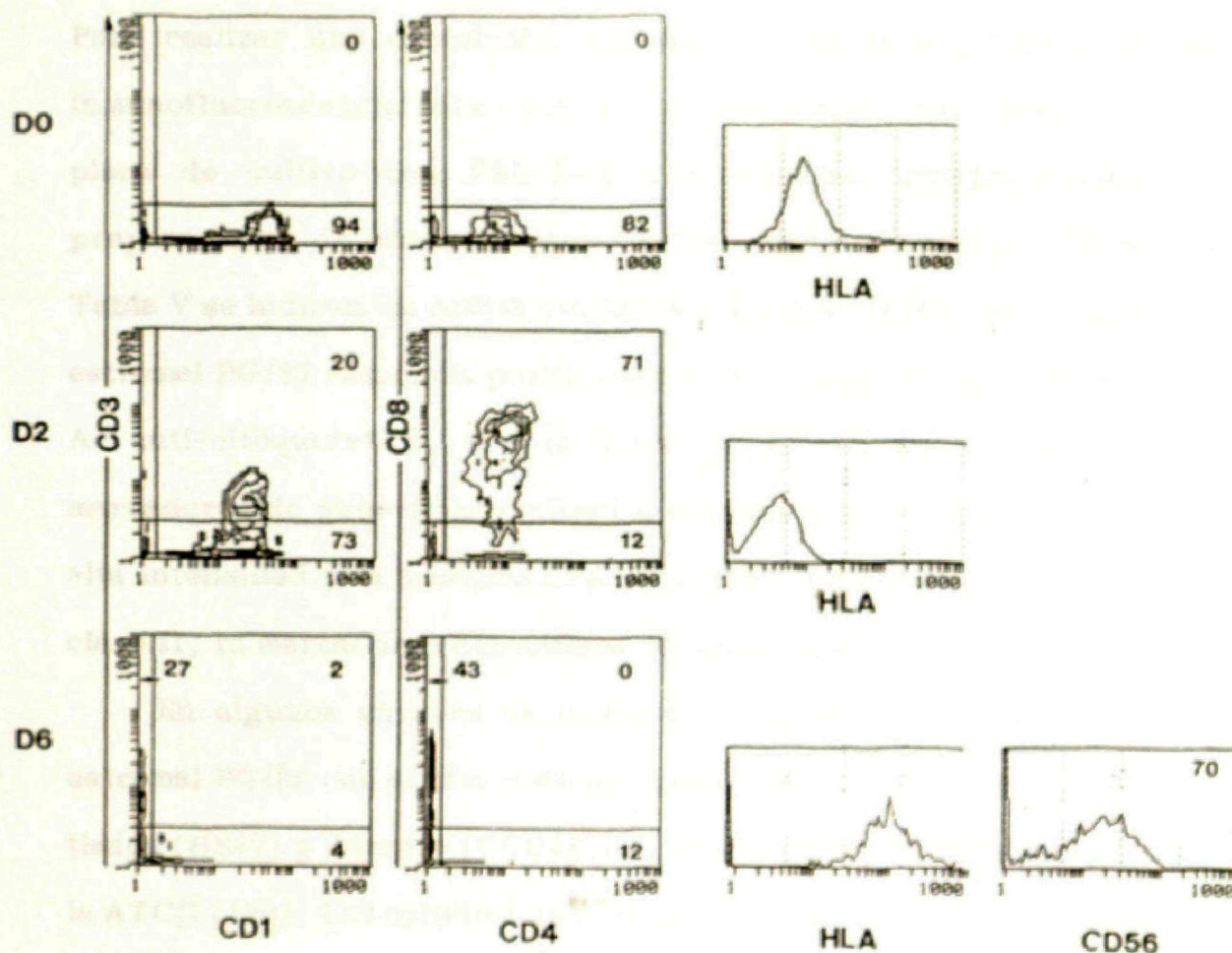


Figura 18. Cambios fenotípicos experimentados por timocitos $CD3^+8^-$ cultivados a una concentración de 2×10^5 células/ml, en presencia de 10 UI/ml de IL-2. Las células se recogieron en los tiempos indicados y se estudió la expresión de diversos antígenos de superficie por inmunofluorescencia directa. Los valores numéricos indican el porcentaje de células positivas para cada marcador (histogramas sencillos) y el porcentaje de células en cada cuadrante (histogramas bidimensionales). Se muestra un experimento representativo de 4 realizados.

predominio de células de aspecto fibroblastoide (Figuras 19A y B). Las células muestran un núcleo oval o redondeado, con uno o varios nucléolos prominentes, y presentan numerosos gránulos y vacuolas en su citoplasma. Para realizar una caracterización más precisa se emplearon técnicas de inmunofluorescencia sobre células en suspensión, tras despegarlas de la placa de cultivo con PBS-EDTA; y técnicas inmunohistoquímicas en preparaciones de células crecidas sobre portas (Figuras 19C y D). En la Tabla V se indican los AcMos utilizados y los resultados del estudio. La línea estromal PG/85 reacciona positivamente con Ac anti-vimentina, pero no con Ac anti-citoqueratina, lo que indica su origen mesenquimático. De los marcadores de superficie analizados expresa moléculas MHC de clase I con alta intensidad y la molécula LFA-3 (CD58). No expresa moléculas MHC de clase II, ni marcadores específicos de los linajes linfocitario y monocítico.

En algunos ensayos de interacción se comparó el efecto de la línea estromal PG/85 con el efecto de dos líneas fibroblásticas humanas de origen tímico (HS67) y dérmico (CCD45SK), obtenidas a partir del banco celular de la ATCC (120). Los estudios de inmunofluorescencia realizados sobre células en suspensión, indican que ambas líneas son fenotípicamente semejantes a la línea PG/85. Como se refleja en la Tabla VI, expresan altos niveles de moléculas MHC de clase I y niveles moderados de CD71. No expresan moléculas MHC de clase II, ni marcadores específicos de otros linajes.

4.2. Efecto de la línea celular PG/85 sobre la proliferación intratímica

En una primera aproximación se estudió el efecto de la línea celular PG/85 sobre la proliferación espontánea e inducida por ésteres de phorbol,

TABLA V. Características de la línea celular PG/85

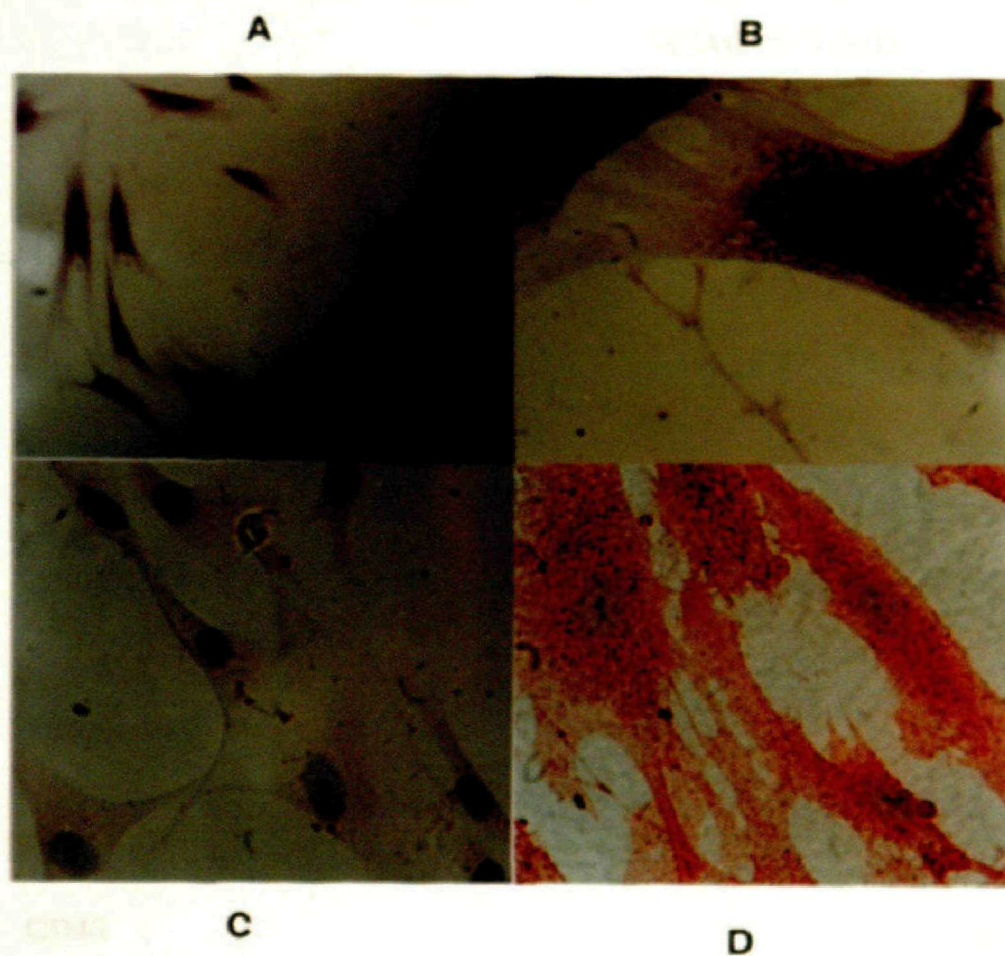


Figura 19. Microfotografías de la línea celular mesenquimatosa de origen tímico PG/85 en cultivos subconfluentes, teñidos con el método de coloración de Giemsa (A y B) ó empleando técnicas inmunohistoquímicas (C: control negativo, D: anti-HLA).

TABLA V. Caracterización de la línea estromal tímica humana PG/85

ANTIGENO	REACTIVIDAD	
	CELULAS FIJADAS	CELULAS EN SUSPENSION
CD1a	-	-
CD1b	-	ND
CD1c	-	ND
CD3	-	-
CD4	-	-
CD8	-	-
CD14	ND	-
CD20	ND	-
CD25	-	ND
CD45	-	ND
CD58	+/-	+
CD71	ND	ND
HLA A, B y C	++	++
HLA DR	-	-
Citoqueratina	-	ND
Vimentina	+	ND

TABLA V. Caracterización de la líneas mesenquimatosas humanas CCD45SK y HS67

ANTIGENO	CCD45SK	HS67
CD1a	-	-
CD1b	-	-
CD1c	-	-
CD3	-	-
CD4	-	-
CD8	-	-
CD14	-	-
CD20	-	-
CD25	-	-
CD45	-	-
CD58	ND	ND
CD71	+	+
HLA A, B y C	++	++
HLA DR	-	-

IL-2 y la combinación de ambos agentes, en subpoblaciones tímicas en diferentes estadios de diferenciación. Para ello, se incubaron 10^5 timocitos sobre microplacas de cultivo que contenían células adherentes preparadas con 24 horas de antelación (500 células/pocillo).

Como se observa en la Figura 20, la presencia de la línea mesenquimal PG/85 inhibe completamente la inducción de proliferación en pretimocitos y timocitos medulares. Por el contrario, en cocultivos de células PG/85 y timocitos corticales se observa una respuesta proliferativa espontánea, de baja intensidad, que no se evidencia en los cultivos de las células corticales aisladas.

4.3. Estudio de la viabilidad celular en cocultivos de la línea estromal PG/85 y subpoblaciones tímicas

Para comprobar si el efecto inhibitor sobre la proliferación era consecuencia de la inducción de fenómenos de muerte celular, se estudió la viabilidad celular durante 3 días en cultivos de diferentes subpoblaciones tímicas, establecidos sobre monocapas de células estromales. En todos los casos la recuperación celular, a las 72 horas de cultivo, fue significativamente menor en presencia de la línea PG/85 (Figura 21). Este fenómeno es especialmente notorio en cultivos de pretimocitos y de timocitos corticales, donde la recuperación celular final fue de un 20 y 15% respectivamente, frente a un 60 y 40% en cultivos control.

4.4. Inducción de apoptosis en subpoblaciones tímicas por la línea estromal PG/85

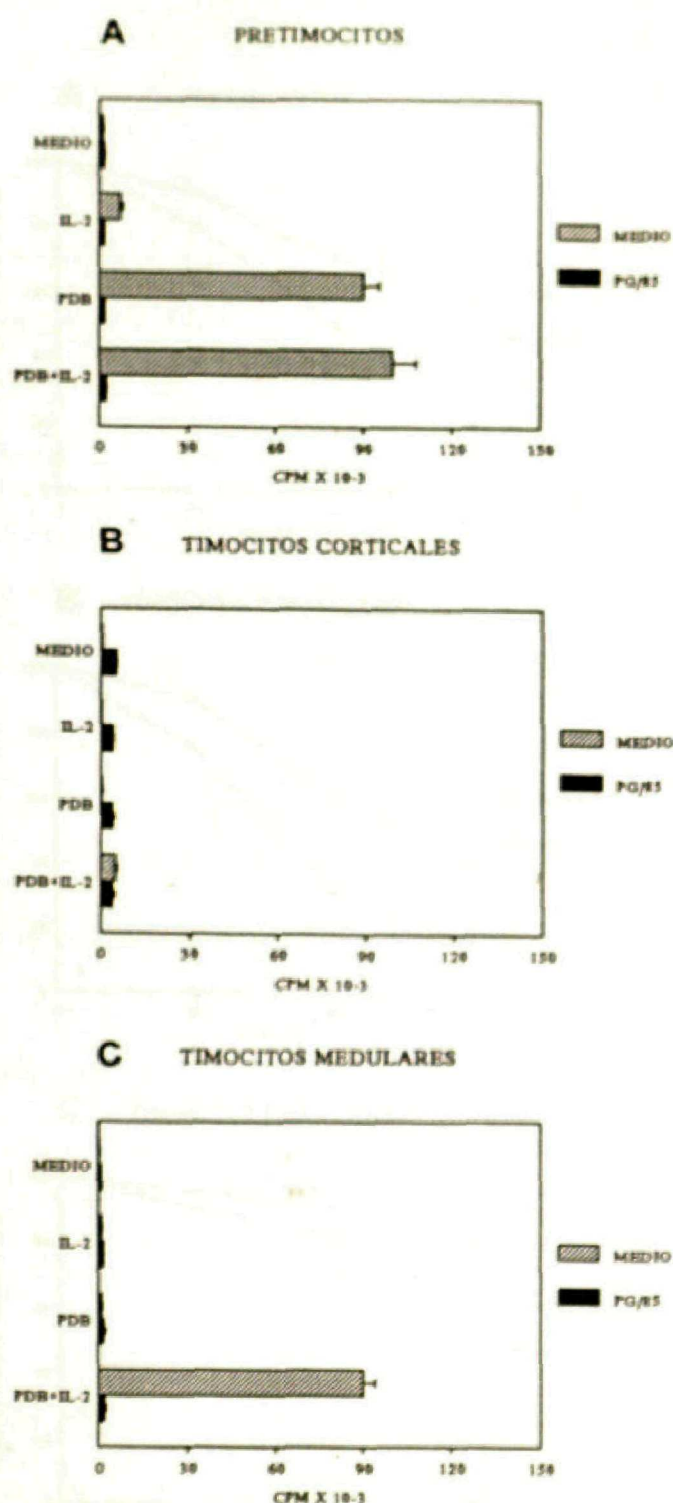


Figura 20. Incorporación de ^3H -timidina por pretimocitos (A), timocitos $\text{CD3}^- \text{HLA}^-$ (B) y CD1a^- (C) (10^5), cultivados durante 3 días en medio o sobre monocapas de la línea celular PG/85, en presencia de IL-2 (10 UI/ml), PDBu_2 (50 ng/ml) o una combinación de ambos. Los resultados mostrados son la media de 3 experimentos \pm DE.

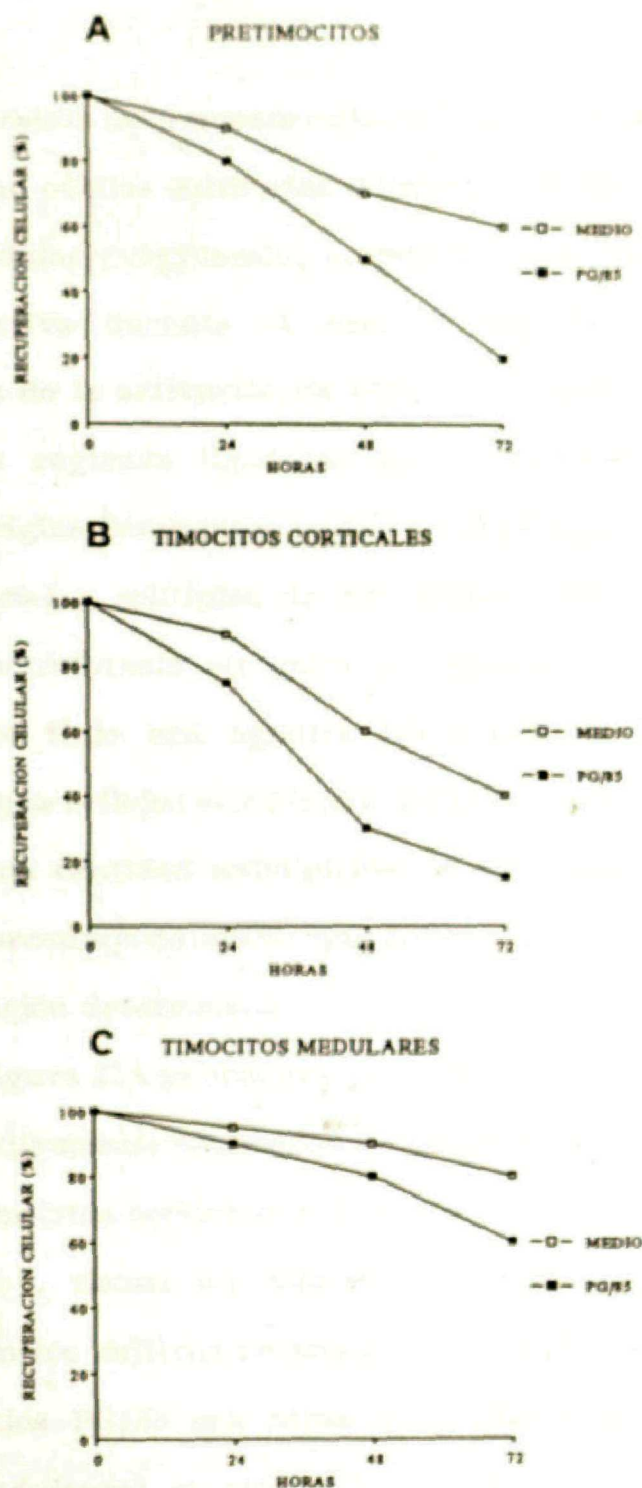


Figura 21. Recuperación celular (%) de pretimocitos (A), timocitos CD3⁺HLA⁺ (B) y CD1a⁺ (C) cultivados a una concentración de 2×10^6 células/ml en medio ó sobre monocapas de la línea celular PG/85. El conteo y análisis de la viabilidad celular se realizó por exclusión con azul tripán a los tiempos indicados.

La naturaleza de la muerte celular, descrita en el apartado anterior, fue investigada en células cultivadas durante 72 horas en presencia de PG/85. La muerte celular programada, o apoptosis, es un proceso de eliminación celular selectiva durante el cual se degrada el ADN nuclear como consecuencia de la activación de endonucleasas endógenas, que cortan el ADN en las regiones ligadoras internucleosómicas. Esta degradación enzimática origina fragmentos de 180 a 200 pb (que corresponden al tamaño del nucleosoma) y múltiplos de los mismos, que pueden ser visualizados mediante electroforesis en geles de agarosa, o utilizando técnicas de citometría de flujo con agentes intercalantes. En este caso, en los histogramas que reflejan el contenido de ADN celular, las células en apoptosis presentan una cantidad subdiploide de ADN (121). Este método permite calcular el porcentaje de células que tienen un contenido hipodiploide de ADN en una población determinada.

En la Figura 22A se observa que la línea mesenquimal PG/85 es capaz de inducir selectivamente fenómenos de apoptosis en las células corticales. Un 76% de los timocitos corticales cultivados en estas condiciones (media de 10 experimentos), tienen un contenido subdiploide de ADN, frente al 5% observado en los cultivos en ausencia de PG/85. En cocultivos de la línea mesenquimática PG/85 con otras subpoblaciones tímicas (pretimocitos y timocitos medulares) y con linfocitos T de sangre periférica, no se observaron fenómenos de muerte celular de esta naturaleza.

En experimentos de interacción similares realizados con subpoblaciones tímicas y con células T, se comprobó que otras líneas fibroblastoideas humanas de origen dérmico (CCD45SK) y tímico (HS67), y monocitos de

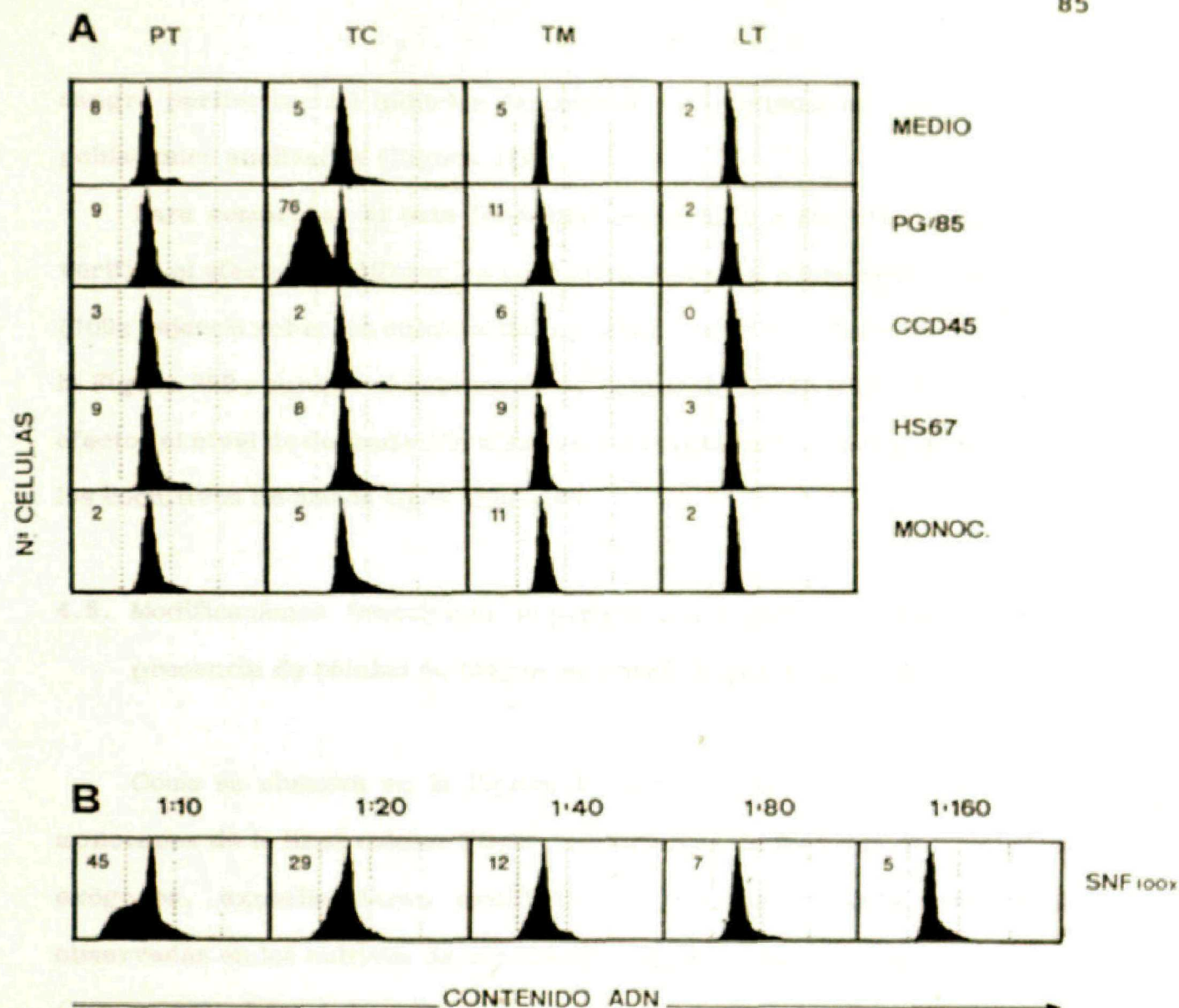


Figura 22. A: Análisis del contenido de ADN de pretimocitos (PT), timocitos CD3⁺HLA⁺ (TC), CD1a⁺ (TM) y linfocitos T (LT) cultivados a una concentración de 2×10^6 células/ml, durante 3 días en medio sin aditivos, sobre monocapas de células estromales (PG/85, CCD45SK ó HS67) o en presencia de monocitos. En cada histograma (eje y: número de células, eje x: intensidad de fluorescencia en escala lineal) se indica el porcentaje de células con contenido subdiploide de ADN. **B:** Análisis del contenido de ADN de timocitos CD3⁺HLA⁺ cultivados a una concentración de 2×10^6 células/ml durante 3 días en presencia de diferentes concentraciones del sobrenadante de cultivo de la línea PG/85 (SNF), previamente concentrado (100x).

sangre periférica, no inducían fenómenos de apoptosis en ninguna de las poblaciones analizadas (Figura 22A).

Para comprobar si este fenómeno era debido a factores solubles, se verificó el efecto que diferentes concentraciones del sobrenadante de PG/85 (100x) ejercía sobre los cultivos de la población cortical. Como se observa en la Figura 22B, aunque el sobrenadante (diluciones 1:20 y 1:10) tiene cierto efecto, el nivel de degradación observado es significativamente menor que en los cocultivos de ambos tipos celulares.

4.5. Modificaciones fenotípicas experimentadas por los pretimocitos en presencia de células de origen estromal. Papel de la IL-2

Como se observa en la Figura 23, los pretimocitos incubados sobre monocapas de la línea celular PG/85, en ausencia de factores de crecimiento exógenos, experimentaron modificaciones fenotípicas semejantes a las observadas en los cultivos de la población en ausencia de células adherentes (Figura 13). A los 3 días del inicio del cultivo las células expresan con baja intensidad las moléculas CD3, CD4 y CD8. El bajo rendimiento celular de los cultivos en presencia de células estromales, no permitió realizar estudios fenotípicos durante periodos más largos.

Aunque la línea PG/85 inhibe las respuestas proliferativas de los pretimocitos, la adición de IL-2 (10 UI/ml) a los cocultivos de esta población sobre monocapas de células estromales (PG/85), mantiene la viabilidad celular en cultivos prolongados (Figura 24) e induce significativas modificaciones fenotípicas de la población precursora. Durante los 3 primeros días de cultivo no se evidencian cambios fenotípicos adicionales respecto a lo observado en

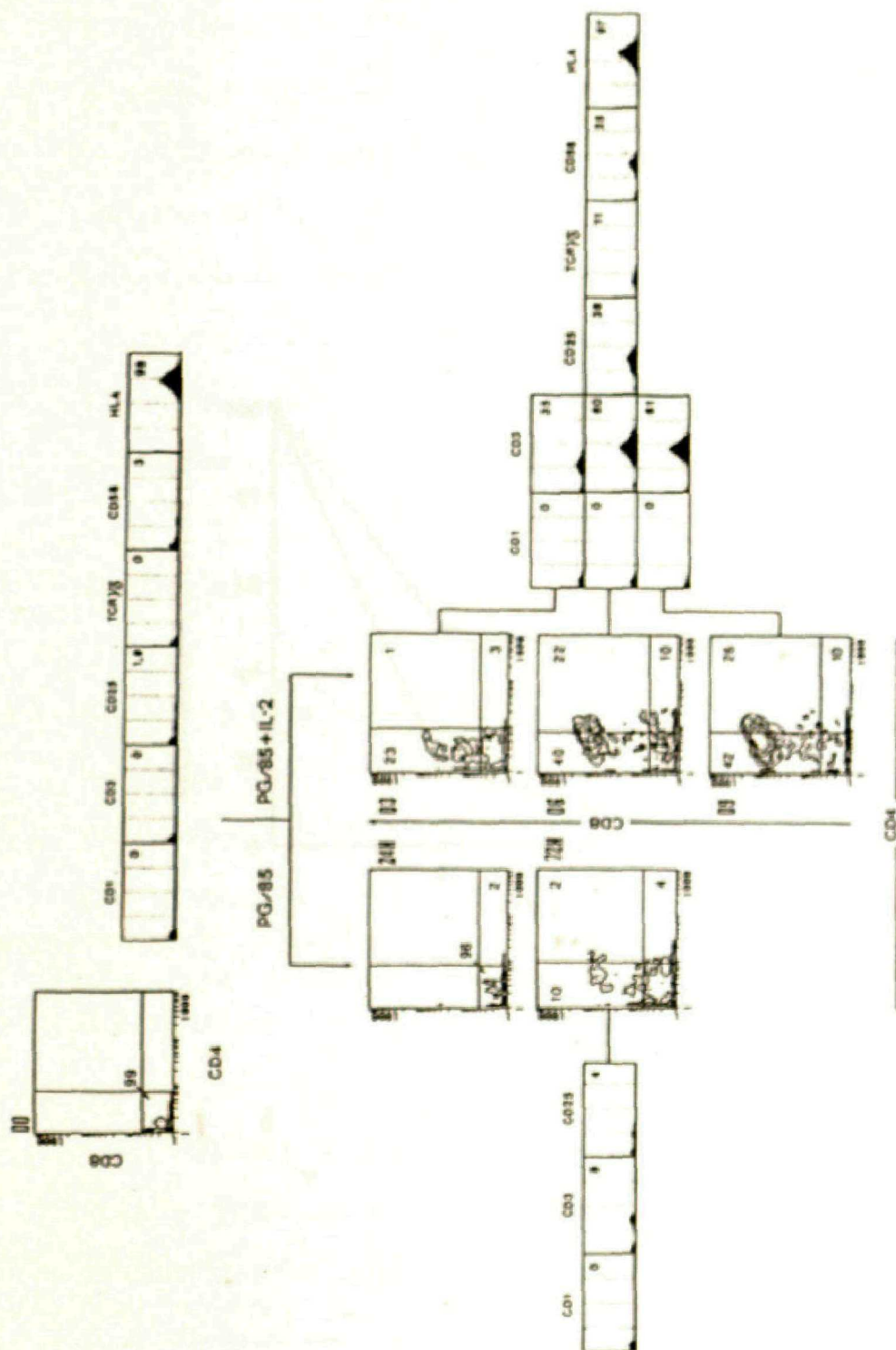


Figura 23. Cambios fenotípicos experimentados por prelinocitos (CD1a⁺3⁺4⁺8⁺) cultivados a una concentración de 2×10^6 células/ml, en medio sin aditivos, y en presencia de IL-2 (10 UI/ml) sobre monocapas de la línea celular PG/85. Las células se recogieron en los tiempos indicados y se estudió la expresión de diversos antígenos de superficie por inmunofluorescencia directa. Los valores numéricos indican el porcentaje de células positivas para cada marcador (histogramas sencillos) y el porcentaje de células en cada cuadrante (histogramas bidimensionales). Se muestra un experimento representativo de 4 realizados.

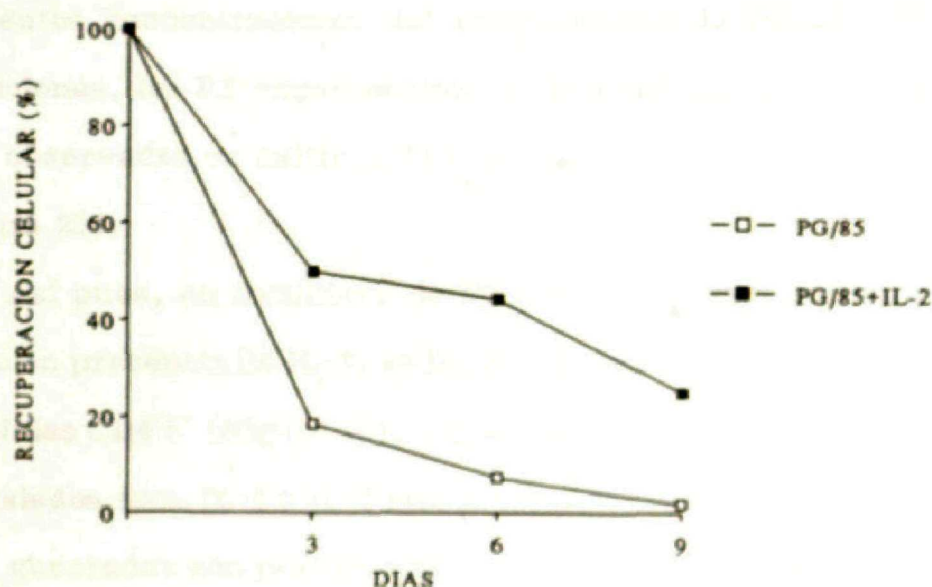


Figura 24. Recuperación celular (%) de pretimocitos ($CD1a^{-}3^{-}4^{-}8^{-}$) cultivados a una concentración de 2×10^6 células/ml, en medio sin aditivos y en presencia de IL-2 (10 UI/ml), sobre monocapas de la línea celular PG/85. El conteo y análisis de la viabilidad celular se realizó por exclusión con azul tripán a los tiempos indicados.

los cocultivos en ausencia de IL-2. Sin embargo, a los 6 días de incubación las células expresan altos niveles de CD3 (60%) y de CD8 (60%) (Figura 23). El nivel de expresión de la molécula CD4 (30%) es mayor que el observado en los cultivos de pretimocitos con IL-2, en ausencia de células estromales (Figura 13). Un 20% de las células generadas en estas condiciones coexpresan ambas moléculas (CD4⁺8⁺), aunque no adquieren la molécula CD1a. Este efecto no se observa cuando la población precursora (PT) se cultiva con IL-2 y diferentes concentraciones del sobrenadante de PG/85 (100x). En estas condiciones, los PT experimentan unas modificaciones fenotípicas similares a las observadas en cultivos de la población con IL-2 en ausencia de PG/85 (Figura 25).

Así pues, en cocultivos de PT con células mesenquimatosas de origen tímico en presencia de IL-2, se induce la aparición de un porcentaje variable de células CD4⁺8⁺ (Figura 23), a diferencia de lo observado en los cultivos de PT aislados (con IL-2 ó IL-2 más sobrenadante de PG/85), donde las células CD3⁺ generadas son positivas simples (CD4 ó CD8) (Figuras 13 y 25).

4.6. Efecto de las células de origen estromal sobre la población CD3⁺4⁺8⁺

Teniendo en cuenta que la población CD3⁺4⁺8⁺ parece representar un estadio transicional, precursor inmediato de la población cortical CD3⁺4⁺8⁺, se estudió el efecto que sobre el proceso de conversión fenotípica espontánea y sobre la población resultante, ejercían diferentes líneas estromales de origen mesenquimatoso (CCD45SK y PG/85). Para ello, se cultivaron 2×10^6 células durante 48 horas sobre monocapas de células estromales, analizando la viabilidad, el fenotipo y el estado del ciclo celular de los timocitos

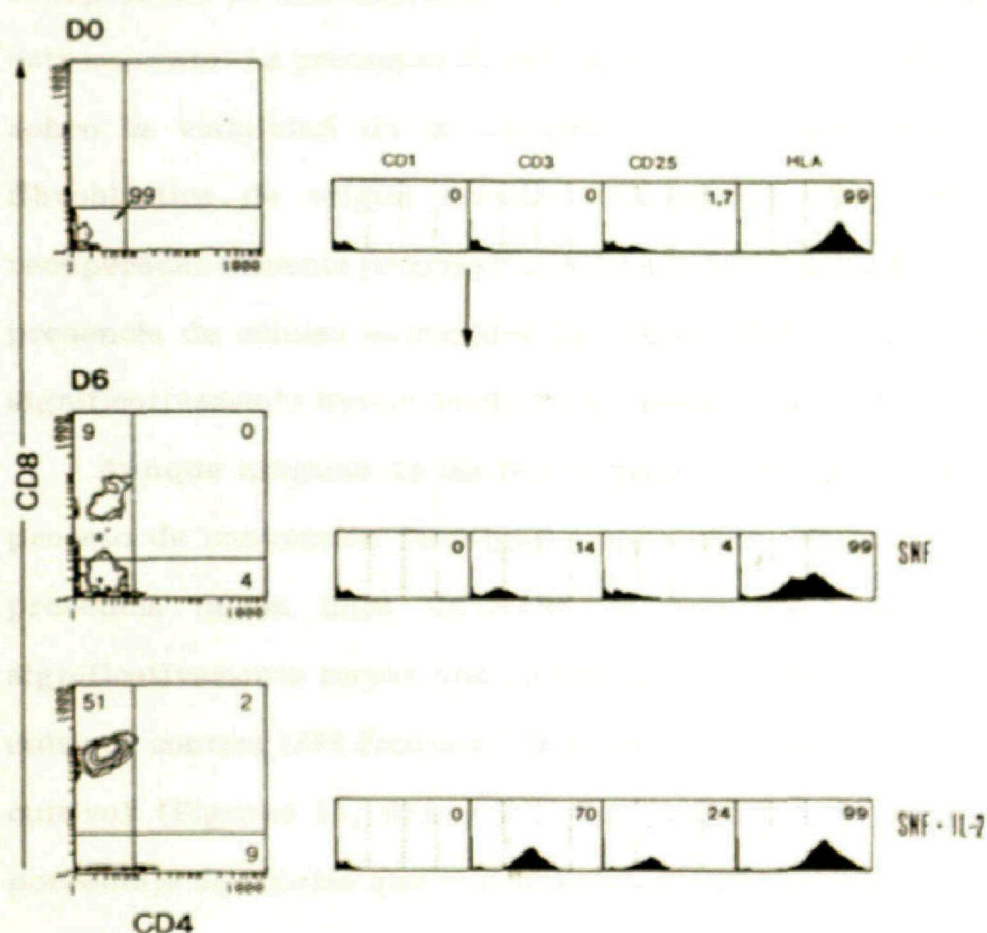


Figura 25. Cambios fenotípicos experimentados por pretimocitos (CD1a⁺3⁺4⁺8⁺) cultivados a una concentración de 2×10^6 células/ml, en presencia de sobrenadante de cultivo de la línea PG/85 (SNF) previamente concentrado (100x) con y sin IL-2 (10 UI/ml). Las células se recogieron en los tiempos indicados y se estudió la expresión de diversos antígenos de superficie por inmunofluorescencia directa. Los valores numéricos indican el porcentaje de células positivas para cada marcador (histogramas sencillos) y el porcentaje de células en cada cuadrante (histogramas bidimensionales). Se muestra un experimento representativo de 4 realizados.

recuperados, a las 18 y 40 horas del inicio del cultivo.

Como ya se ha indicado (Apartado 3.1. y Figura 15) durante las primeras 18 horas de cultivo de la población CD3⁺8⁺, el número de células recuperadas se incrementa un 20%, disminuyendo gradualmente a partir de este momento. La presencia de células estromales tiene efectos contrapuestos sobre la viabilidad de la población CD3⁺8⁺. En presencia de la línea fibroblástica de origen dérmico (CCD45SK) el porcentaje de células recuperadas aumenta progresivamente a lo largo del cultivo, mientras que en presencia de células estromales de origen tímico (PG/85) la viabilidad es significativamente menor desde las primeras fases del cultivo (Figura 26).

Aunque ninguna de las líneas estromales modifica sustancialmente el proceso de conversión fenotípica programada de la población CD3⁺8⁺, en presencia de la línea CCD45SK el porcentaje de células CD4⁺8⁺ es significativamente mayor que en los cocultivos con la línea PG/85 y en los cultivos control (85% frente a 70% y 71%, respectivamente, a las 40 horas de cultivo) (Figuras 15, 27A y B). Con respecto a la expresión de CD3, el porcentaje de células que expresan (bajos niveles) esta molécula es similar en ambos casos al observado en los cultivos control (15-20%) (Figuras 27C y D). Igualmente PG/85 induce un incremento significativo (porcentual y en intensidad) en el nivel de expresión de las moléculas MHC de clase I, que no se observa en cultivos control y en cocultivos de la población sobre monocapas de CCD45SK, en los que se objetiva una pérdida progresiva de HLA (Figuras 27E y F).

El estudio del ciclo celular de la población incubada sobre monocapas de células PG/85, revela que a las 40 horas una proporción significativa (50%) de las células presentan un contenido subdiploide de ADN (Figura 27J). Este

Figura 27. Efecto de las líneas estromales (PG/85 y CCD45SK) sobre la conversión fenotípica programada de la población CD3⁺8⁺. El cultivo se realizó por exclusión celular en presencia de las líneas estromales.

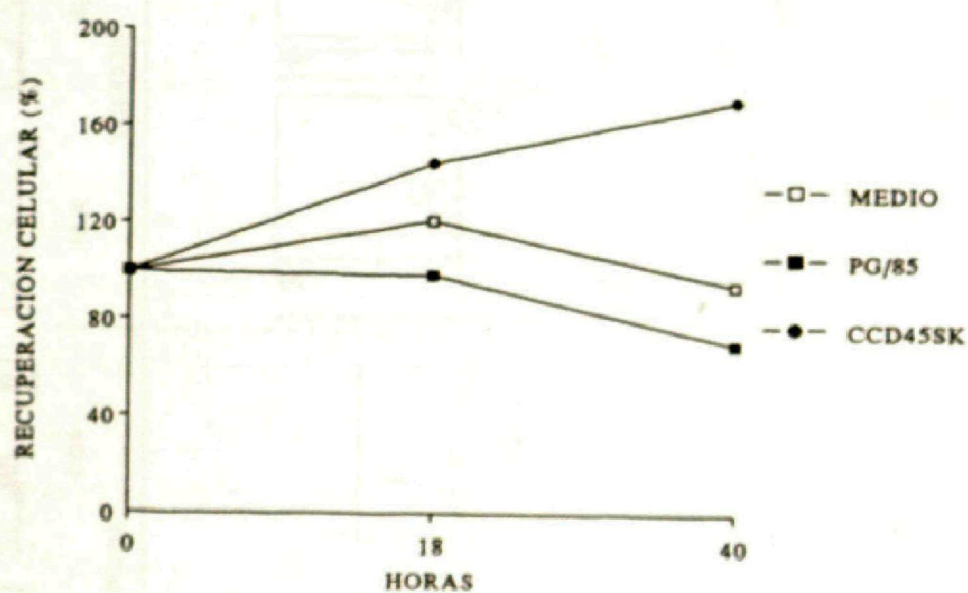


Figura 26. Recuperación celular (%) de timocitos $CD3^+8^-$ cultivados a una concentración de 2×10^6 células/ml, en medio y sobre monocapas de células estromales (PG/85 y CCD45SK). El conteo y análisis de la viabilidad celular se realizó por exclusión con azul tripán a los tiempos indicados.

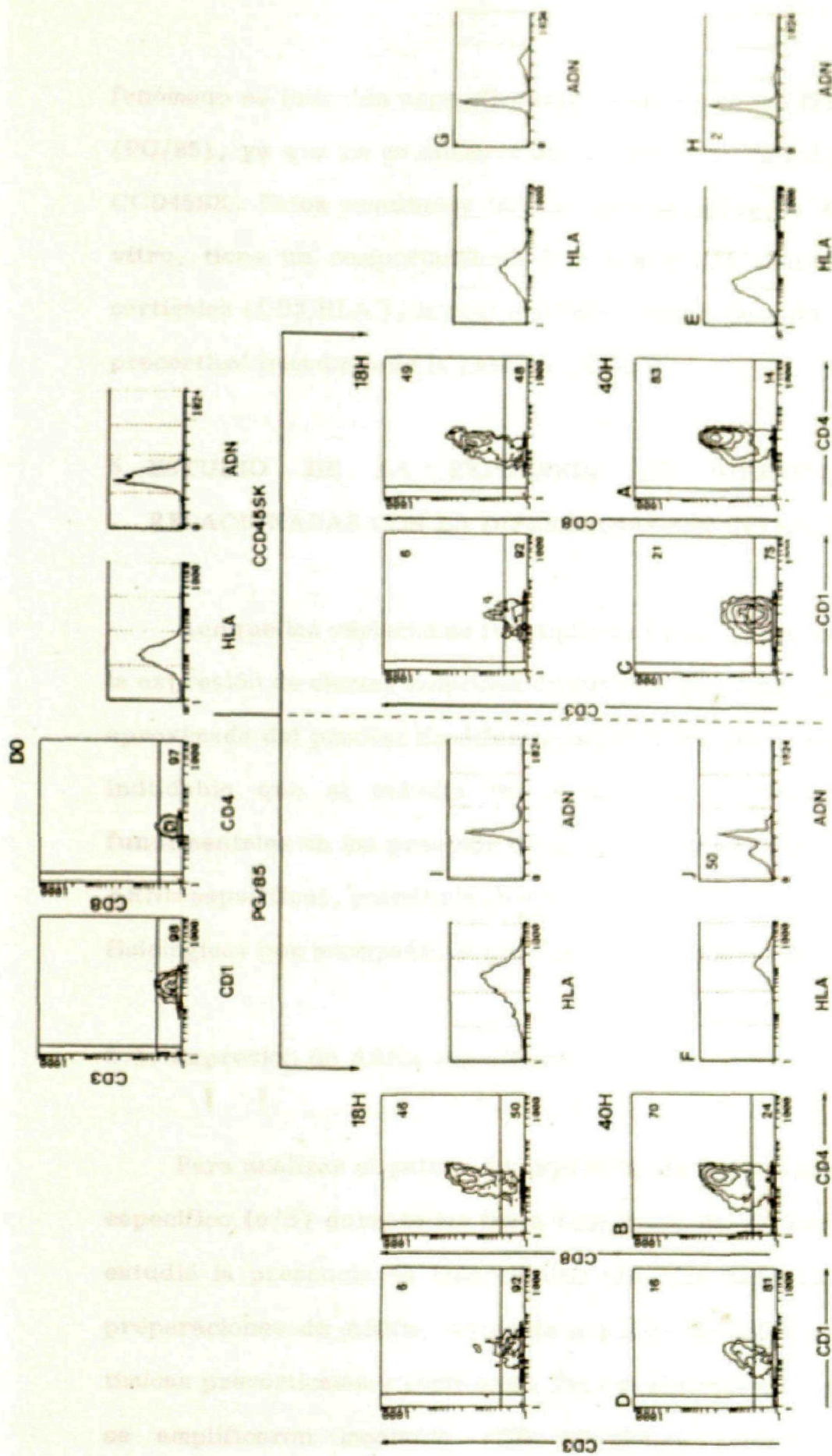


Figura 27. Análisis del estado del ciclo celular y de la expresión de moléculas de superficie de timocitos CD3⁺8⁻ cultivados a una concentración de 2×10^6 células/ml, sobre monocapas de células estromales (PG/85 y CCD45SK). Las células se recogieron en los tiempos indicados analizando la expresión de diferentes moléculas de superficie por inmunofluorescencia directa, y el contenido de ADN tras tratamiento con IP. Los valores numéricos indican el porcentaje de células positivas para cada marcador (histogramas sencillos) y el porcentaje de células en cada cuadrante (histogramas bidimensionales). En los histogramas que reflejan contenido de ADN se indica el porcentaje de células con contenido subdiploide. Se muestra un experimento representativo de 4 realizados.

fenómeno es inducido específicamente por esta línea fibroblastoidea tímica (PG/85), ya que no se observa en los cultivos control ni en presencia de CCD45SK. Estos resultados indican que la población CD4⁺8⁺ generada *in vitro*, tiene un comportamiento frente a PG/85 similar al de las células corticales (CD3⁺HLA⁺), lo cual reafirma la naturaleza de estadio transicional precortical inmediato de la población CD3⁺8⁺.

5. ESTUDIO DE LA EXPRESION DE DIFERENTES MOLECULAS RELACIONADAS CON LA DIFERENCIACION INTRATIMICA

Aunque las variaciones fenotípicas observadas a través del análisis de la expresión de ciertas moléculas de superficie, permiten obtener una visión aproximada del proceso de diferenciación intratímico de los linfocitos T, es indudable que el estudio de la síntesis de determinadas moléculas fundamentales en los procesos de selección (y su relación con la presencia ARNm específico), permitiría obtener una visión más cercana de los procesos fisiológicos que acompañan o preceden la evolución intratímica.

5.1. Expresión de ARNm específicos

Para analizar el patrón de expresión de las subunidades del receptor específico (α/β) durante las fases tempranas del desarrollo intratímico, se estudió la presencia de transcritos para las cadenas TCR α y TCR β en preparaciones de ARNm, obtenido a partir de diferentes subpoblaciones tímicas precorticales y corticales. Tras la síntesis de una cadena de ADNc, se amplificaron mediante PCR diluciones seriadas de los híbridos

ARNm/ADNc, empleando cebadores específicos para las regiones constantes de las cadenas α y β del TCR (Tabla IV).

Como se observa en la Figura 28, es posible detectar ARNm para la cadena β del TCR en estadios muy inmaduros del desarrollo. Los niveles de ARNm- β aumentan gradualmente en poblaciones más diferenciadas, observándose el incremento más significativo en la población $CD3^+8^-$, tras un periodo de cultivo de 18 horas en medio sin aditivos. La expresión de la cadena TCR α es más tardía y no se detectan transcritos hasta el estadio $CD3^+8^-$.

5.2. Marcaje metabólico

El estudio se realizó comparativamente en la línea tumoral humana MOLT-4, cuyo estadio de diferenciación equivale al de un timocito inmaduro (122); y en las subpoblaciones tímicas $CD3^+8^-$, $CD3^+HLA^+$ y $CD1a^+$. Tras la incorporación de precursores *in vitro* (^{35}S -Met:Cys), las células se lisaron con Triton X-114 y se separaron las fases acuosa (A) y detergente (D). Aliquotas de ambas fases se inmunoprecipitaron con los AcMos 4WF (anti-TCR β) y SPvT3b (anti-CD3 ϵ), y las fracciones no adsorbidas se reprecipitaron con los AcMos NA1/34 (anti-CD1a) y W6/32 (anti-HLA A, B y C). Los inmunoprecipitados obtenidos se separaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) en condiciones reductoras, y se revelaron por fluorografía.

El AcMo 4WF anti-TCR β precipita en MOLT-4 (fases A y D) una proteína de 36-37 Kd, mientras que en timocitos $CD3^+8^-$ y en timocitos corticales inmunoprecipita dos productos de 38 y 35 Kd, predominantemente en la fase

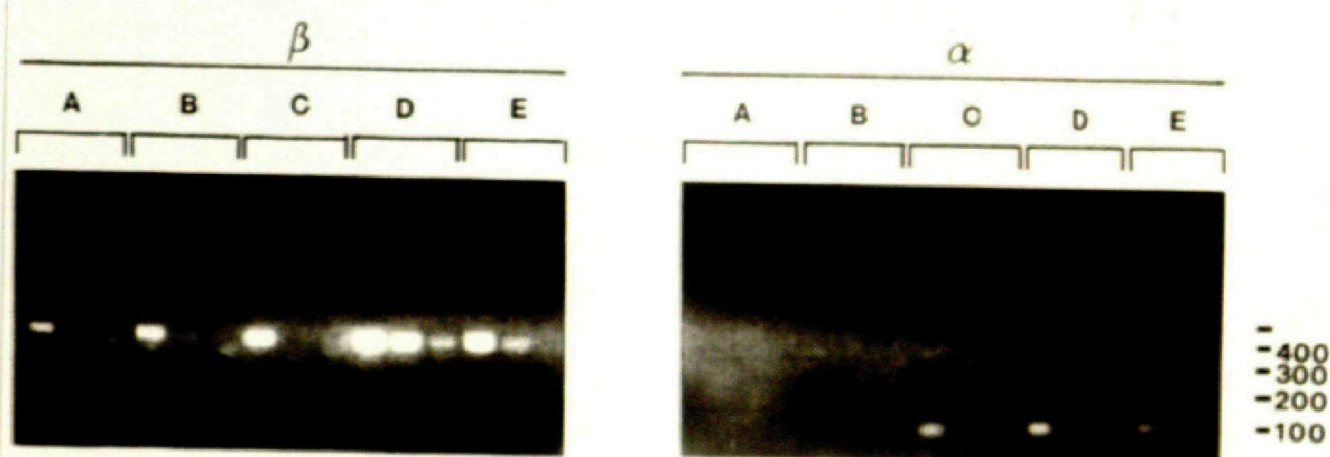


Figura 28. Análisis mediante electroforesis en geles de agarosa y tinción con BE de los productos de amplificación obtenidos a partir de diluciones seriadas (1:10) de la solución ARNm/ADNc de pretimocitos (CD1a⁺3⁺4⁺8⁺) (A), timocitos TN (CD3⁺4⁺8⁺) (B), CD3⁺8⁺ (C), CD3⁺8⁺ tras un periodo de incubación de 18 horas en medio sin aditivos (D) y CD3⁺HLA⁺ (E), empleando cebadores específicos para TCR β (β) y TCR α (α).

D (Figura 29). Por el contrario, en células medulares el AcMo 4WF inmunoprecipita, fundamentalmente en la fase D, dos proteínas de 43-44 y 38 Kd (Figura 29) que corresponden, respectivamente, a las posiciones esperadas de las cadenas α y β del TCR. No obstante, la existencia en todos los inmunoprecipitados (especialmente en la fase A) de una estructura no específica de 44-45 Kd, dificulta la interpretación de estos resultados. En lo que respecta al complejo CD3, el AcMo SPvT3b precipita en MOLT-4 una estructura única de aproximadamente 23 Kd, mientras que en todas las subpoblaciones tímicas estudiadas inmunoprecipita, exclusivamente en la fase D, dos proteínas de 25 y 23 Kd cuyo peso molecular es similar al de las cadenas γ y δ/ϵ del CD3, respectivamente (Figura 29). Es interesante destacar que a pesar de las diferencias observadas en la síntesis de las subunidades TCRA y TCRB, los timocitos tanto inmaduros ($CD3^{-}8^{-}$ y $CD3^{-}HLA^{-}$) como maduros ($CD1a^{-}$) producen cantidades semejantes de CD3.

El AcMo NA1/34 no precipita ningún producto, mientras que W6/32 inmunoprecipita (en la fase D) en todas las poblaciones, excepto en timocitos corticales, dos proteínas de 42-43 y 12 Kd (Figura 30A) que corresponden a la cadena α y $\beta 2$ -microglobulina, respectivamente. En relación con el CD1a este fenómeno ha sido observado por otros autores (C. Milstein, comunicación personal).

5.3. Expresión en superficie celular

Teniendo en cuenta que el marcaje metabólico no refleja la expresión de una proteína determinada en la membrana plasmática, y que en algunos casos los AcMos reconocen epítopos crípticos (en células viables) de ciertas

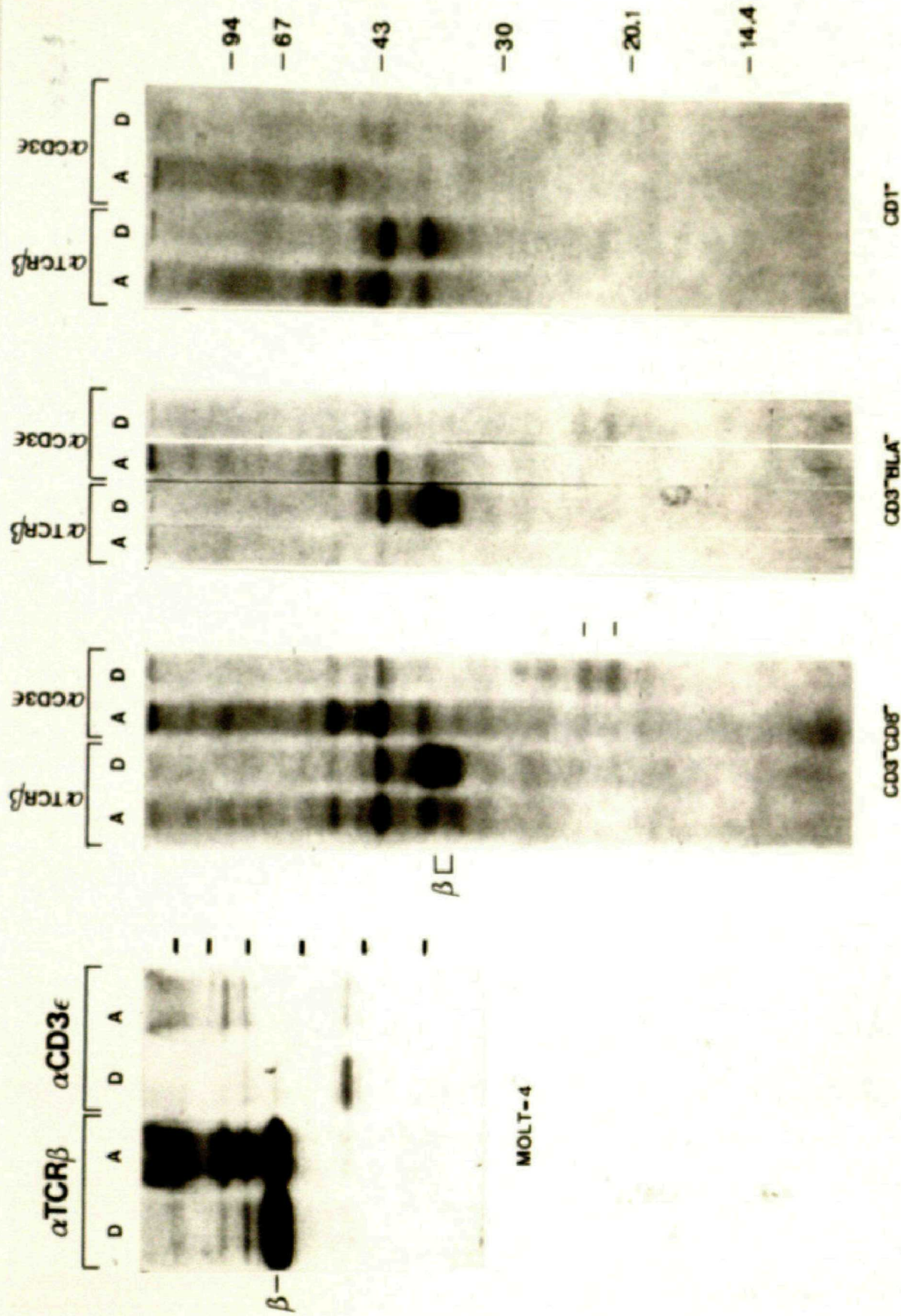


Figura 29. Fluorografía de proteínas marcadas con ^{35}S inmunoprecipitadas con los AcMos 4WF (anti-TCR β) y SPvT3b (anti-CD3 ϵ) de las fases acuosa (A) y detergente (D) de lisados (Triton X-114) de MOLT-4, timocitos CD3 $^{+}$, CD3 $^{+}$ HLA $^{+}$ y CD1a $^{+}$. Las proteínas adsorbidas se analizaron mediante electroforesis en SDS-PAGE, en condiciones reductoras. Como controles de peso molecular se emplearon fosforilasa b (94), BSA (67), ovoalbúmina (43), anhidrasa carbónica (30), inhibidor tripsina (20) y lisozima (14,4).

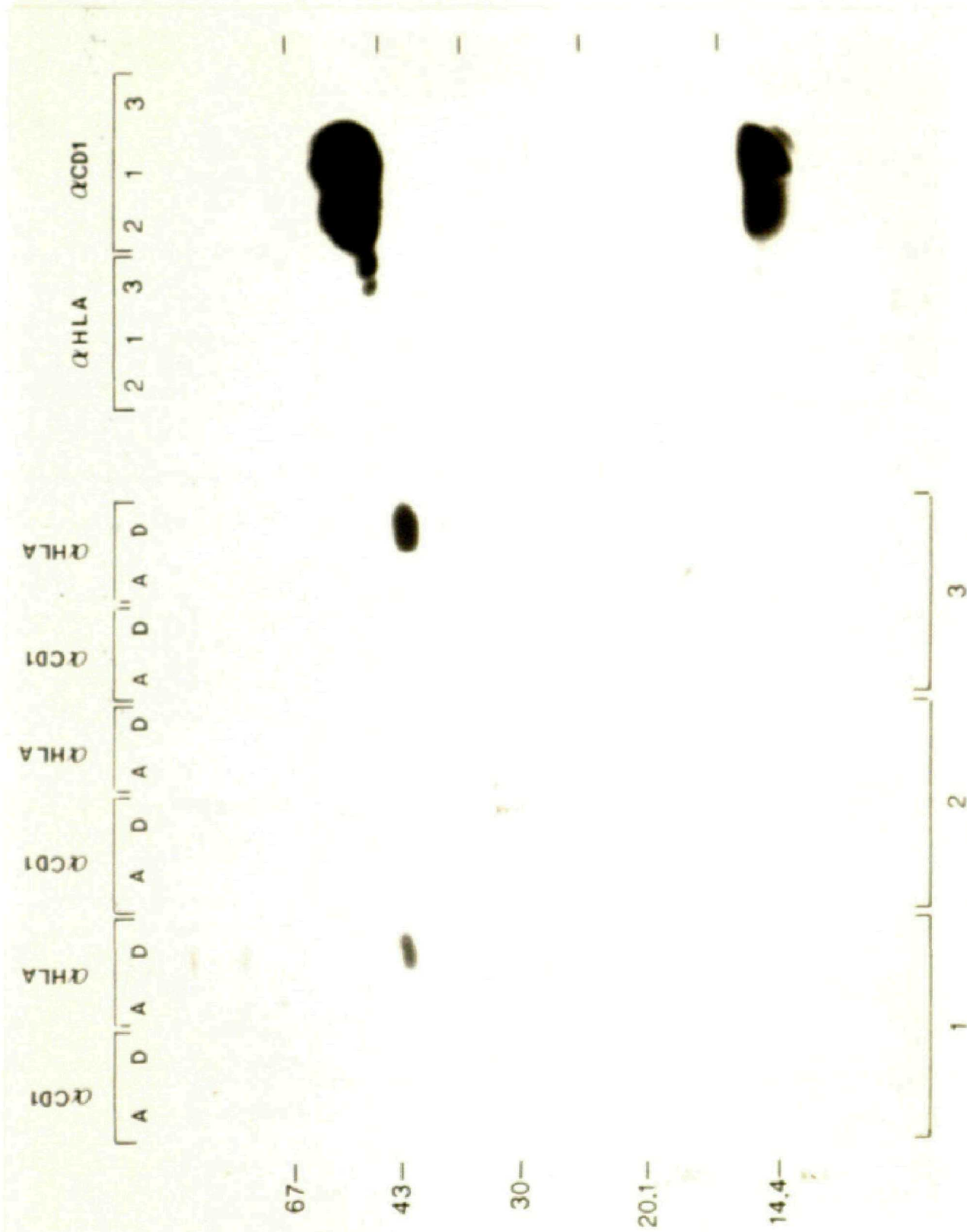


Figura 30. A: Fluorografía de proteínas marcadas con ^{35}S inmunoprecipitadas con los AcMos NA1/34 (anti-CD1a) y W6/32 (anti-HLA) de las fases acuosa (A) y detergente (D) de lisados (D) de timocitos CD3 $^{+}$ 8 $^{-}$ (1), CD3 $^{+}$ HLA $^{+}$ (2) y CD1a $^{+}$ (3). **B:** Autorradiografía de proteínas marcadas con ^{125}I inmunoprecipitadas con los AcMos NA1/34 (anti-CD1a) y W6/32 (anti-HLA) de lisados (Triton X-100) de timocitos CD3 $^{+}$ 8 $^{-}$ (1), CD3 $^{+}$ HLA $^{+}$ (2) y CD1a $^{+}$ (3). Ver leyenda Figura 29 para detalles.

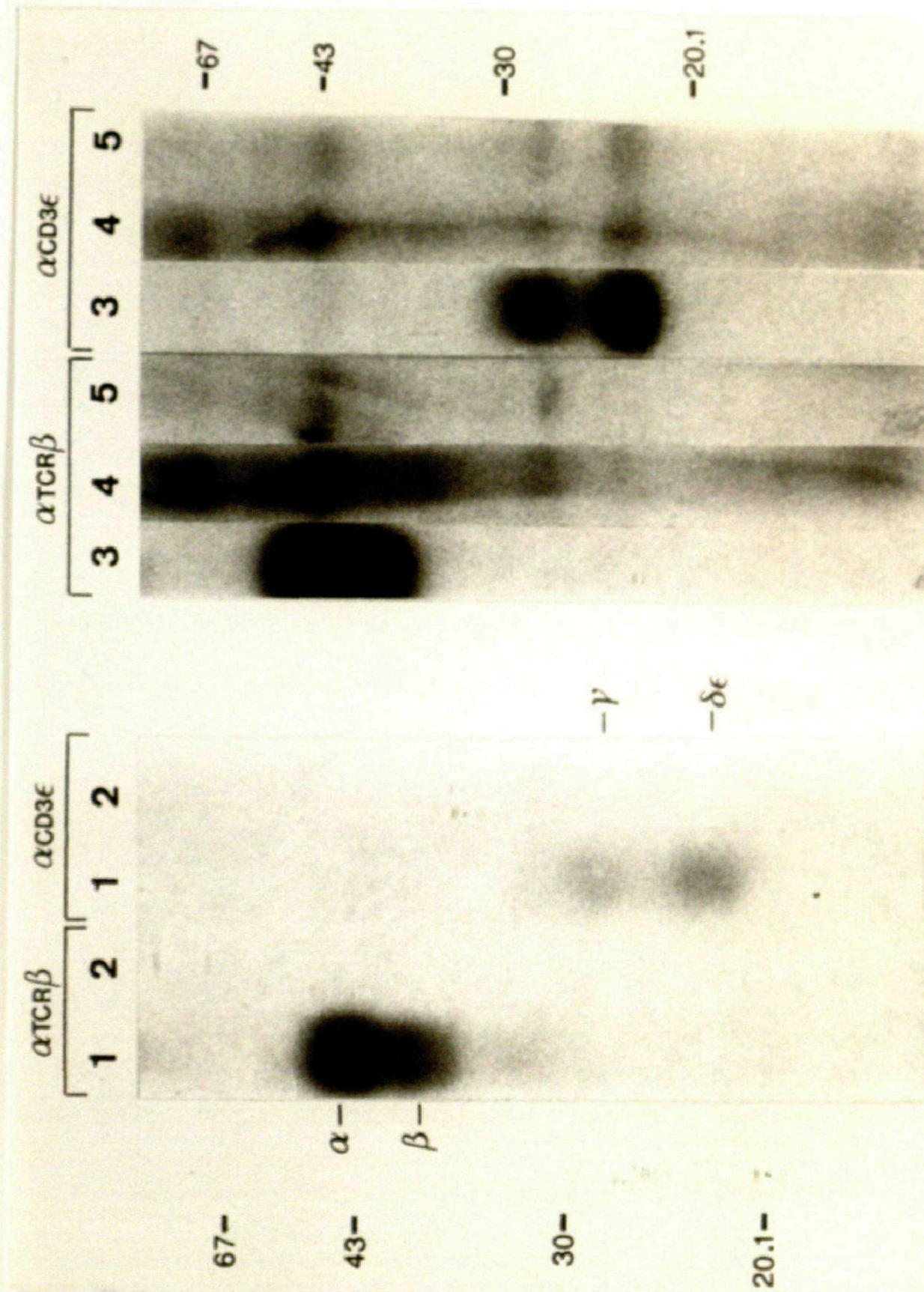


Figura 31. Autorradiografía de proteínas marcadas con ^{125}I inmunoprecipitadas con los AcMos 4WF (anti-TCR β) y SPvT3b (anti-CD3 ϵ) de lisados (Triton X-100) de linfocitos T (1), MOLT-4 (2), timocitos CD1a $^{-}$ (3), CD3 $^{-}$ HLA $^{-}$ (4) y CD3 $^{+}$ (5). Las proteínas adsorbidas se analizaron mediante electroforesis en SDS-PAGE, en condiciones reductoras. Como controles de peso molecular se emplearon fosforilasa b (94), BSA (67), ovoalbúmina (43), anhidrasa carbónica (30), inhibidor tripsina (20) y lisozima (14.4).

El timo es el órgano donde se produce la maduración de los linfocitos T (124). Durante este proceso, y bajo la influencia del microambiente tímico, las células precursoras originadas en tejidos hematopoyéticos siguen un programa de desarrollo que incluye complejos cambios a nivel fenotípico y genotípico. Este programa comprende fases de expansión celular, reordenamiento génico (TCR), diferenciación y selección del repertorio (72). Durante este proceso únicamente se permitirá la maduración de aquellos timocitos cuyos receptores reconozcan moléculas del MHC presentes en el timo (selección positiva), y se eliminarán aquellas células con potencial autorreactivo (selección negativa).

Nuestros datos demuestran que una proporción sustancial de los timocitos humanos postnatales están en división (11,5%). La mayoría de las células en fases S/G₂/M expresan CD1a y son CD3 negativas. Asimismo, todas las subpoblaciones CD3⁻ aisladas contienen una alta proporción de células en ciclo, lo cual indica que el proceso de expansión celular ocurre durante los estadios iniciales de la diferenciación intratímica. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en timo postnatal murino, que indican que la división celular finaliza antes de iniciarse la expresión del complejo TCR-CD3 (125, 126).

La mayoría de las células en división expresan niveles intermedios/altos de HLA (HLA^{B/SUP}) (Figura 2A). De acuerdo con trabajos anteriores realizados en nuestro laboratorio (66), durante la transición hacia el estadio de diferenciación CD4⁺8⁺, los timocitos reducen progresivamente el nivel de expresión de HLA y adquieren CD1a, expresando niveles muy bajos o indetectables de HLA en el punto en el cual se inicia la expresión del complejo TCR-CD3. La síntesis y expresión de HLA se reinicia en fases posteriores de

la diferenciación, incrementándose gradualmente durante la transición hacia el estadio positivo simple (medular). Así pues, la ventana de expresión de niveles intermedios/altos de HLA puede corresponder a dos estadios bien definidos dentro del proceso madurativo. La ausencia de células en fases S/G₂/M entre los timocitos CD3⁺, indica que el punto de máxima división intratímica corresponde al estadio inicial de disminución de la expresión de HLA. Los estudios realizados empleando sistemas de triple marcaje confirman que las células con niveles intermedios/altos de HLA (HLA^{h/sup}) en división, son CD3⁻ (Figura 4B).

En este sentido, la purificación de una población CD3⁻8⁻ (CD1⁺4⁺) que expresa niveles intermedios/altos de HLA, y que contiene la mayor proporción de células en división dentro de las subpoblaciones aisladas, confirma la presencia de una importante población precortical en proceso de expansión. La significativa contribución de esta subpoblación al total de células en división, puede deducirse igualmente de los estudios realizados con tres fluorocromos, ya que un 25% de las células en ciclo son CD4⁺8⁻. En este sentido, aunque las células positivas simples han sido consideradas clásicamente como poblaciones maduras homogéneas, diferentes estudios indican que tanto en ratón como en humanos existe una considerable heterogeneidad fenotípica (127, 128). En ratón se han descrito subpoblaciones inmaduras CD3⁻4⁻8⁻ (129, 130) y CD3⁻4⁻8⁺ (131, 132), que representan estadios transicionales alternativos entre los timocitos CD4⁻8⁻ y CD4⁺8⁺. Aunque existe una gran variabilidad entre cepas de ratón, la población murina predominante (CD3⁻4⁻8⁺) contiene una alta proporción de células en división (131). Por otra parte, es descartable que la población CD3⁻4⁻8⁻ sea equivalente a la subpoblación CD4^{low}H-2⁺, que representa el

tipo celular más temprano identificado en timo postnatal murino (133), debido a las diferencias en el nivel de expresión de moléculas MHC de clase I. No obstante en las preparaciones $CD3^+8^-$, hemos identificado una subpoblación minoritaria $CD1a^+4^+RA^+HLA^A$ (2,6%) que podría corresponder, aunque no se puede afirmar con seguridad, a un tipo celular similar al de la población murina antes mencionada. La población precortical $CD3^+4^+8^-$ puede ser equivalente a la subpoblación $CD4^+8^{low}$ descrita *in situ* en humanos, que expresa niveles intermedios de HLA (134). Recientemente, mediante el empleo de sistemas de citometría multiparamétrica, se han identificado (*in situ*) en humanos poblaciones $CD3^+4^+8\alpha^+B^-$ y $CD3^+4^+8\alpha^+B^+$, mientras que la subpoblación $CD3^+4^+8^+$ es prácticamente indetectable (127). Nuestros datos coinciden con los obtenidos *in vitro*, empleando sistemas de cultivo de órganos quiméricos con timocitos humanos postnatales, que revelan la existencia de una considerable heterogeneidad fenotípica dentro de la población $CD4^+$ positiva simple; y mediante la inyección intratímica de progenitores T (allogénicos) en xenoinjertos de timo humano fetal en ratones SCID-hu, que confirman la trascendencia de la población $CD4^+8^-$ como estadio transicional intermedio entre las células $CD4^+8^-$ y $CD4^+8^+$ (135, 136). Todos estos datos confirman la singularidad de la población $CD1a^+3^+4^+8^-HLA^{B/SUP}$ identificada en nuestro trabajo, y la importancia de su *status* proliferativo dentro del esquema de desarrollo intratímico.

Aunque los experimentos realizados no proporcionan información directa ni completa sobre las relaciones precursor/progenie, la caracterización de las subpoblaciones precorticales aisladas y el estudio (*in vitro*) de las modificaciones fenotípicas (espontáneas/inducidas), sugiere que el orden de diferenciación previo a la expresión del complejo CD3, podría ser

PT-TN-CD4⁸⁻/CD4⁸⁻-CD4⁸⁺. De gran importancia en este esquema es el nivel de expresión de las moléculas MHC de clase I, cuya reducción progresiva se inicia en el estadio TN, coincidiendo con el inicio de la expresión de CD1a. La expresión de las moléculas correceptoras CD4 y CD8 ocurriría posteriormente en subpoblaciones transicionales diferentes antes de alcanzar el estadio CD4⁸⁺, siendo la subpoblación CD4⁸⁻ cuantitativamente más importante en humanos que la subpoblación alternativa CD4⁸⁺ (136).

El estudio del ciclo celular de las subpoblaciones tímicas inmaduras (CD3⁻) aisladas, muestra importantes diferencias en la distribución celular entre las distintas fases del ciclo, lo que sugiere que durante la fase de expansión celular existen diferencias significativas en la capacidad de proliferación y renovación celular. El ciclo celular de los pretimocitos se caracteriza por presentar una mayor proporción de células en fases G₂/M en relación con poblaciones más diferenciadas, lo que podría indicar que un número considerable de las células en división retornan al estado de reposo sin experimentar modificaciones fenotípicas. Esto sugiere que los PT pueden tener cierto potencial de autorrenovación, o bien que en estadios muy inmaduros del desarrollo las células experimentan un proceso de expansión previo a la diferenciación. Los resultados obtenidos en ratón apoyan esta última posibilidad dado que, tras la administración *in vivo* de BrdUrd, se observa un descenso inmediato en el número absoluto de células CD4⁸⁻, lo cual demuestra que estas células no se comportan como verdaderas células troncales, y que su renovación es debida fundamentalmente al aporte de células exógenas (137). Por el contrario, en las preparaciones de timocitos CD3⁴⁸⁻ y CD3⁸⁻ la mayoría de las células en división están en fase S. El

proceso de conversión fenotípica espontánea que experimenta la población $CD3^+4^+8^-$ ($\rightarrow CD4^+8^+$), y la correlación existente entre el porcentaje de células que adquieren CD8 durante el periodo de cultivo (70%), con el porcentaje de células en fase S en la preparación basal (60%), sugiere que esta población está en un proceso programado de diferenciación asociado a la proliferación. En este sentido, el estudio *in vitro* de la población $CD3^+8^-$ en presencia de agentes antimitóticos, demuestra que ambos procesos (diferenciación y división) están asociados en este estadio del desarrollo madurativo. Teniendo en cuenta además que, en contraste con otros pasos del desarrollo intratímico, la conversión $CD4^+8^- \rightarrow CD4^+8^+$ no requiere la presencia de un microambiente intacto, nuestros resultados sugieren que la secuencia de expresión antigénica (CD8 y TCR/CD3) es consecuencia del desarrollo de un programa autónomo tras la entrada de la célula en división.

Por otra parte aunque la población cortical contiene la mayoría de las células en ciclo (65%), presenta la menor tasa de división en relación a las poblaciones precedentes, lo que indica un descenso progresivo en el potencial generativo a medida que los timocitos se aproximan al punto de expresión del complejo CD3-TCR. El análisis del ciclo celular en esta población ($CD4^+8^+$), indica igualmente que en este estadio se produce la expansión final del "pool" de precursores, sin experimentar modificaciones fenotípicas adicionales.

El análisis *ex vivo* de la proliferación espontánea sugiere que la población $CD3^+8^-$ experimenta dos ciclos sucesivos de división. La adición de colcemida disminuye un 30% los niveles de incorporación de 3H -timidina a las 18 horas. Teniendo en cuenta que en las preparaciones basales de timocitos $CD3^+8^-$, la práctica totalidad de las células en división están en fase S, y que

durante este periodo (16-18 horas) una proporción considerable de las mismas finalizan el ciclo, nuestros resultados sugieren que un porcentaje variable de células, una vez alcanzado el estadio CD4⁺8⁺, inician una segunda fase de división. Por el contrario, el mínimo efecto que la colcemida ejerce sobre la proliferación espontánea de la población cortical, indica que la mayoría de las células en división presentes en las preparaciones de timocitos CD4⁺8⁺, están en su último ciclo de división. En conjunto estos datos podrían indicar que una vez alcanzado el estadio de diferenciación CD4⁺8⁺, las células no se dividen más que una vez. En este sentido nuestros datos concuerdan con los obtenidos *in vivo* en ratones adultos, mediante la inyección de BrdUrd y de precursores radiactivos (138, 139).

Nuestros resultados reflejan la existencia de una transición RA-R0-RA a lo largo del proceso madurativo, lo cual indica que las isoformas del CD45 pueden desempeñar un importante papel en el desarrollo intratímico de los linfocitos T. Mientras que en los estadios más inmaduros (PT) las células expresan preferentemente la isoforma de alto peso molecular (RA), su nivel de expresión disminuye progresivamente a través del estadio TN, a la vez que se incrementa la expresión de CD45R0. Las poblaciones CD3⁺8⁺ y CD3⁺HLA⁺ contienen en su mayoría células CD45R0⁺. Estos resultados sugieren que una proporción considerable de los timocitos CD45R0⁺ están en un punto del proceso madurativo previo a la selección, lo cual contradice la hipótesis planteada por Pilarski et al. (140), que propone que la molécula CD45RA sería un marcador del linaje generativo, mientras que la expresión de CD45R0 acompañaría el destino de las células seleccionadas negativamente. Aunque la razón de la discrepancia con nuestros datos no está clara, es posible que el método utilizado para determinar el potencial generativo de las

subpoblaciones RA/R0 (actividad clonogénica tras tratamiento con Con A y TCGF), no detecte la actividad de todas las subpoblaciones transicionales. De hecho se han descrito diferencias en la sensibilidad a interleuquinas entre distintas subpoblaciones tímicas (118). En este sentido, trabajos recientes también cuestionan el aparente valor de la molécula CD45RA como marcador del linaje generativo (141).

Un aspecto fundamental del desarrollo de la célula T es la adquisición de madurez funcional. En los linfocitos T maduros la asociación del ligando antigénico y la molécula TCR, genera señales que son transmitidas al interior celular por el complejo CD3. Estas señales, en cooperación con las recibidas a través de otras moléculas de superficie, originan la producción de una serie de mediadores intracelulares ($[Ca^{2+}]_i$, PKC) que inducen la expresión de diversos genes, cuyos productos permitirán a la célula responder a factores solubles (receptores de membrana), sintetizar hormonas, adquirir capacidad citolítica, etc (34, 41). Teniendo en cuenta que el ensamblaje y expresión de un complejo TCR-CD3 plenamente competente, es un acontecimiento relativamente tardío en el proceso madurativo de los linfocitos T (128), el estudio del proceso de capacitación funcional puede ser abordado de forma más precisa, analizando la inducibilidad de ciertos genes individuales (IL-2, IL-2R α , IL-4, etc.). Debido a la ausencia de un conocimiento exacto de las moléculas de superficie implicadas en la generación de señales en los estadios inmaduros del desarrollo, y dado que la activación de la PKC (al igual que la presencia de una elevada concentración de $[Ca^{2+}]_i$) es necesaria para la expresión de determinados genes (46), en nuestro trabajo hemos utilizado ésteres de phorbol, que originan una activación directa y persistente de la PKC, para estudiar la inducibilidad de respuestas génicas a lo largo del

desarrollo intratímico.

Nuestros resultados indican que la programación necesaria para la inducibilidad de ciertas respuestas génicas (IL-2, IL-2R α), se inicia durante fases muy tempranas del desarrollo intratímico (PT), mucho antes de que exista una base para la selección positiva (expresión TCR-CD3). Un aspecto fundamental derivado de nuestro estudio es que durante la transición entre el estadio DN y el estadio DP, representado por la población CD3⁺4⁺8⁺, se inicia un proceso de pérdida de funcionalidad del circuito IL-2/IL-2R (IL-2⁺/IL-2R⁺), cuya consecuencia final es el bloqueo de la inducibilidad de los genes de la IL-2 y del IL-2R en el estadio cortical (IL-2⁺/IL-2R⁺). Es interesante destacar que esta pérdida de respuesta, que ocurre cuando las células se aproximan al período de selección, se mantiene (parcialmente) en los timocitos medulares TCR-CD3⁺ (IL-2⁺/IL-2R⁺). Teniendo en cuenta que la inducibilidad del gen de la IL-2 se pierde antes (transición DN-SP CD3⁺), y se recupera después (transición SP CD3⁺-LT) que la del gen del IL-2R, el fenómeno de pérdida de respuesta podría representar un proceso programado de ajuste de la fisiología celular, que proporcionaría las precondiciones necesarias para la selección positiva y negativa. En este sentido, se ha planteado que el defecto en la secreción de IL-2 que presentan los timocitos medulares, puede ser un mecanismo fisiológico implicado en el proceso de selección negativa, ya que señales iniciadas a través del receptor específico inducen un proceso de activación abortiva que puede condicionar la eliminación selectiva (apoptosis) de las células con potencial autorreactivo (142).

Debido a que algunos de los componentes necesarios para inducir una respuesta proliferativa en linfocitos T (inducibilidad plena de los genes de

la IL-2 y del IL-2R α) son adquiridos durante las fases tempranas del desarrollo intratímico, se ha planteado que los timocitos podrían utilizar, durante las fases iniciales del proceso de expansión celular, los mismos receptores y factores de crecimiento que utilizan los linfocitos T de sangre periférica, aunque inducidos a través de un receptor alternativo (18). Sin embargo, la mayoría de los estudios realizados indican que los factores de crecimiento implicados en la proliferación intratímica, son diferentes de los producidos por los linfocitos T maduros (143). En este sentido, nuestros resultados indican que la IL-2 es capaz de inducir respuestas proliferativas dosis-dependientes en poblaciones tímicas inmaduras (PT), y que paralelamente las células expresan marcadores característicos de estadios más avanzados del desarrollo (CD3, CD4 y CD8). Las células blásticas CD3⁺ generadas expresan las moléculas CD4 y CD8 (fundamentalmente ésta última) de forma mutuamente exclusiva. Es importante destacar que aunque esta población CD3⁺ positiva simple se expande progresivamente y llega a ser la población mayoritaria en el cultivo, aparecen proporciones significativas de células TCR γ/δ ⁺ y CD56⁺. No obstante hay que considerar que la capacidad de una subpoblación tímica para responder *in vitro* a un factor de crecimiento, es reflejo de su potencial proliferativo y de diferenciación, pero no demuestra que esta hormona ejerza un papel relevante en condiciones fisiológicas. Nuestros resultados sugieren que en estas condiciones de cultivo la IL-2 parece inducir un programa de desarrollo celular (anómalo) que no se asemeja a la diferenciación fisiológica. Sin embargo, y dado que en este sistema (ausencia de células estromales) la IL-2 parece inducir selectivamente el desarrollo de células TCR α/β ⁺CD8⁺ y TCR γ/δ ⁺, no se puede excluir que se puedan estar mimetizando vías de desarrollo extratímicas, ya que tanto las

células $\text{TCR}\alpha/\beta^+\text{CD8}^+$ como las células $\text{TCR}\gamma/\delta^+$ incluyen linajes o sublinajes que pueden desarrollarse extratímicamente en condiciones fisiológicas (144). En este sentido, se ha propuesto que las células $\text{TCR}\alpha/\beta^+\text{CD8}^+$, $\text{TCR}\gamma/\delta^+$ y NK podrían ser variantes de un linaje hematopoyético diferente al de las células $\text{TCR}\alpha/\beta^+\text{CD4}^+$ (18). Por otra parte, es posible que la elevada proporción de células CD56^+ observada en cultivos de PT en presencia de IL-2, pueda ser consecuencia de la expansión de una población preexistente (promovida por la IL-2), dado que en las preparaciones basales de pretimocitos ($\text{CD1a}^-\text{3}^-\text{4}^-\text{8}^-\text{DR}^-$) es posible detectar un porcentaje variable de células CD56^+ (Figura 13).

Otro aspecto no suficientemente conocido en el desarrollo intratímico de los linfocitos T, es el papel que las interacciones linfo-estromales desempeñan en la regulación del proceso madurativo (54). Trabajos recientes sugieren una implicación estadio-específica de las células estromales, de modo que las células de origen mesenquimatoso podrían desempeñar un papel fundamental durante las fases iniciales del desarrollo, mientras que las células epiteliales regularían estadios posteriores de la diferenciación (145). En este sentido, y dado que algunos datos previos (146, 147) indicaban que células estromales (presentes en las suspensiones de pretimocitos) eran necesarias para inducir (*in vitro*) un estado de respuesta a la IL-2, en nuestro trabajo hemos analizado las modificaciones que una línea celular mesenquimatoso de origen tímico (PG/85), obtenida en nuestro laboratorio, induce en los cultivos de PT en presencia de IL-2. Nuestros resultados indican que en estas condiciones de cultivo, aunque las células no adquieren CD1a ni reducen los niveles de expresión de HLA, siguen un patrón de diferenciación más cercano a la transición fisiológica ($\text{CD4}^-\text{8}^- \rightarrow \text{CD4}^+\text{8}^+$), ya que

es posible identificar una proporción significativa de células CD4^{8'}. Teniendo en cuenta que este efecto no es inducido por los sobrenadantes de la línea PG/85 (en presencia de IL-2), en conjunto nuestros datos sugieren que los fibroblastos pueden desempeñar un papel importante en los estadios iniciales del desarrollo intratímico y que esta influencia está mediada fundamentalmente a través de contactos celulares.

Por otra parte, la inducción de fenómenos de apoptosis en timocitos corticales por cocultivo con PG/85, posee especial relevancia en relación con los esquemas actuales de interpretación del desarrollo intratímico de los linfocitos T. Este proceso es inducido exclusivamente en este estadio de diferenciación (CD4^{8'}), y específicamente por esta línea estromal mesenquimatosa, ya que no se observan fenómenos similares en otras subpoblaciones tímicas, ni en cocultivos de timocitos corticales con monocitos u otras líneas fibroblásticas (CCD45SK y HS67). Este efecto no parece estar mediado exclusivamente por factores solubles, dado que aunque el sobrenadante de la línea PG/85 tiene cierto efecto dosis-dependiente, la magnitud de la apoptosis inducida es mucho menor.

Teniendo en cuenta que en las células corticales la apoptosis puede ser desencadenada por una amplia variedad de estímulos (principalmente glucocorticoides) (148), y que durante el desarrollo de los timocitos la ausencia de señales de rescate apropiadas (vía TCR) implica la muerte por apoptosis de una gran proporción de células (74), es posible que los resultados observados en nuestro sistema apunten hacia una probable participación de las células no linfoides en la eliminación de las células no seleccionadas positivamente (muerte por ausencia de señal de rescate). En este sentido cabe destacar la coincidencia que existe entre el estadio de

diferenciación en el que se considera operaría la selección positiva, y el estadio sobre el que la línea PG/85 ejerce su efecto. Nuestros resultados sugieren que la inducción de fenómenos de apoptosis, en ausencia de selección positiva, no es consecuencia de una programación interna previa de la célula, sino que parece ser una respuesta a determinadas señales ambientales (que no serían operativas en las células seleccionadas positivamente). En este sentido, aunque se ha planteado que los glucocorticoides podrían proporcionar esta señal (148, 149), nuestros resultados indican que células no linfoides presentes en el microambiente tímico poseen la capacidad de inducir apoptosis en determinados estadios (cortical) del desarrollo intratímico, lo que sugiere que la presencia de factores exógenos (biorritmos de glucocorticoides extratímicos) no es estrictamente necesaria.

Es importante reseñar que la línea mesenquimatosa PG/85 no sólo es capaz de inducir fenómenos de apoptosis en timocitos corticales, sino en células $CD4^+8^+$ generadas *in vitro* a partir de la población $CD3^+8^-$, lo que sugiere que la progenie de esta población transicional $CD3^+4^+8^-$ presenta unas características semejantes a las células $CD3^+4^+8^+$. Este dato refuerza aún más la posición de la población $CD3^+4^+8^-$ como precursora inmediata de las células corticales, en timo humano postnatal.

En trabajos recientes realizados en timocitos inmaduros de ratones transgénicos y en líneas celulares TCR γ transfectadas, se ha podido detectar la expresión en membrana de la cadena TCR β (monómeros u homodímeros) en ausencia de cadena TCR α , aisladamente (150) o en asociación con componentes del CD3 (δ y ϵ) (151, 152). Por otra parte, en ratones RAG $^-$ (deficientes en los genes activadores de recombinasas) que presentan un

bloqueo madurativo a nivel del estadio $CD4^+8^-$, se ha observado que la introducción de un transgen $TCR\beta$ corrige este defecto (153, 154). En este caso el producto del transgen $TCR\beta$ se expresa de forma estable en la superficie celular (en ausencia de otras cadenas TCR) en asociación con las subunidades $CD3\gamma$, δ y ϵ (pero no con la cadena ζ). Estos estudios sugieren que determinados aspectos de la fase inicial del programa de desarrollo de los linfocitos T (transición $CD4^+8^- \rightarrow CD4^+8^+$), podrían ser dependientes de la expresión en membrana de un complejo TCR inmaduro (α^-/β^+). Sin embargo, en estos trabajos no se detectó la presencia de otras moléculas adicionales asociadas a la cadena $TCR\beta$ (a semejanza de lo observado en las células pre-B). No obstante, se ha sugerido que durante el proceso de generación de diversidad, los precursores T (al igual que las células pre-B) podrían verificar si el reordenamiento ha sido productivo depositando el producto del gen reordenado en la superficie celular, de forma que el correcto ensamblaje de los complejos $TCR\beta$ podría ser suficiente para generar las señales apropiadas e inducir la diferenciación celular (155). Asimismo, existen evidencias experimentales que sugieren que el control ejercido en este punto del desarrollo por las proteínas $TCR\beta$ podría ser independiente de la especificidad de su región V, a diferencia de lo que ocurriría en estadios posteriores, en los cuales la selección/diferenciación depende de la especificidad del $TCR\alpha/\beta$ (156).

La peculiar posición de las subpoblaciones $CD3^+8^-$ y $CD3^+HLA^-$ en la transición $CD4^+8^- \rightarrow CD4^+8^+$, nos ha llevado a estudiar el patrón de expresión de los genes de las cadenas $TCR\alpha$ y $TCR\beta$. Nuestros resultados apoyan la naturaleza precortical de las células $CD3^+8^-$ dado que, tanto esta población ($CD3^+4^+8^-$) como la población cortical ($CD3^+4^+8^+$), presentan niveles altos de

ARNm-TCR β y parecen sintetizar exclusivamente cadena TCR β , en contraste con lo observado en poblaciones más diferenciadas (CD3 $^{+}$ 4 $^{+}$ 8 $^{-}$ y CD3 $^{+}$ 4 $^{-}$ 8 $^{+}$) donde las células producen también cantidades apreciables de TCR α (Figura 29).

Por otra parte, en lisados de timocitos inmaduros (CD3 $^{-}$ 8 $^{-}$ y CD3 $^{-}$ HLA $^{-}$) marcados con 35 S-aminoácidos, el AcMo anti-TCR β 4WF precipitó, fundamentalmente en la fase detergente, dos proteínas de 38 y 35 Kd, que posiblemente representan diferentes formas glicosiladas de la cadena β , mientras que en lisados de células marcadas en superficie con 125 I, 4WF precipitó niveles muy bajos de dos estructuras de 45 y 27 Kd. Es posible que la proteína de 45 Kd corresponda a una forma altamente glicosilada de cadena TCR β . Es interesante reseñar la coincidencia de esta estructura dimérica precipitada con anti-TCR β , con la descrita en la membrana de las células pre-B, donde la cadena μ_n se asocia con una estructura similar a una cadena ligera ($V_{pre-B} - \lambda 5/14.1$) (157). Sin embargo, y aunque la metodología utilizada no nos permite determinar si existe una asociación entre las estructuras de membrana reconocidas por 4WF y los componentes del CD3, cabe destacar la coincidencia existente entre el tamaño aparente de la subunidad menor (27 Kd) y el de la cadena CD3 γ . Por ello y dado que se ha descrito una asociación predominante entre esta subunidad y la cadena TCR β (dentro del complejo TCR-CD3) (158), no se puede excluir que la estructura de 45/27 Kd identificada en nuestro trabajo en la membrana de timocitos inmaduros (CD3 $^{-}$ 4 $^{+}$ 8 $^{-}$ y CD3 $^{-}$ 4 $^{-}$ 8 $^{+}$), pueda estar constituida exclusivamente por cadenas TCR β asociadas con subunidades del CD3 (γ y δ/ϵ). En este sentido, son necesarios estudios adicionales para dilucidar la naturaleza de esta proteína de 27 Kd asociada con la cadena TCR β , y su posible relación estructural y/o

funcional con otras proteínas de interés inmunológico. En todo caso, la síntesis y expresión de cadena TCR β en los timocitos CD3⁺4⁺8⁺, aumenta el interés de esta subpoblación como objetivo de ulteriores estudios y su relación con los eventos iniciales de los procesos de selección.

La complejidad del proceso de diferenciación intratímica no ha impedido en los últimos años la elaboración de diversos esquemas que resaltan las relaciones precursor/progenie, y otras características de los sucesivos estadios a través de los cuales los elementos precursores originan timocitos maduros. Elemento central en estos esquemas es la población CD4⁺8⁺, a la que se atribuye la iniciación de los procesos de selección del repertorio. Esta población constituye la progenie de estadios precorticales mal definidos y es la precursora de las poblaciones maduras, caracterizadas por su similitud fenotípica, aunque no funcional, con los linfocitos T.

En un intento de integrar los datos de este trabajo, y de estudios previos realizados en nuestro laboratorio, con las ideas prevalentes sobre la diferenciación tímica, proponemos un modelo hipotético esquematizado en la Figura 32, que resume en distintos apartados: A) la regulación de la expresión de las subunidades del complejo TCR(α/β)-CD3 a lo largo de la vía madurativa, donde las flechas continuas representan vías confirmadas del desarrollo y las flechas discontinuas probables vías alternativas. B) las relaciones de proliferación/diferenciación en distintos estadios madurativos y el posible papel de las interacciones con diferentes componentes del estroma tímico. C) los valores numéricos (\pm DE) que reflejan: C₁) porcentaje de células en diferentes subpoblaciones CD3⁺, C₂) porcentaje de células en fases S/G₂/M dentro de cada subpoblación y C₃) porcentaje de células en división dentro de cada subpoblación ($C_1 \times C_2 / 100$), respecto al total de células en el timo. Es interesante señalar que el valor de ΣC_3 es concordante con el porcentaje de células en división observado *in situ* en timo humano postnatal ($11,5 \pm 1,8\%$). Los perfiles representados (color) reflejan el patrón de expresión de distintas moléculas de membrana relevantes en el proceso de

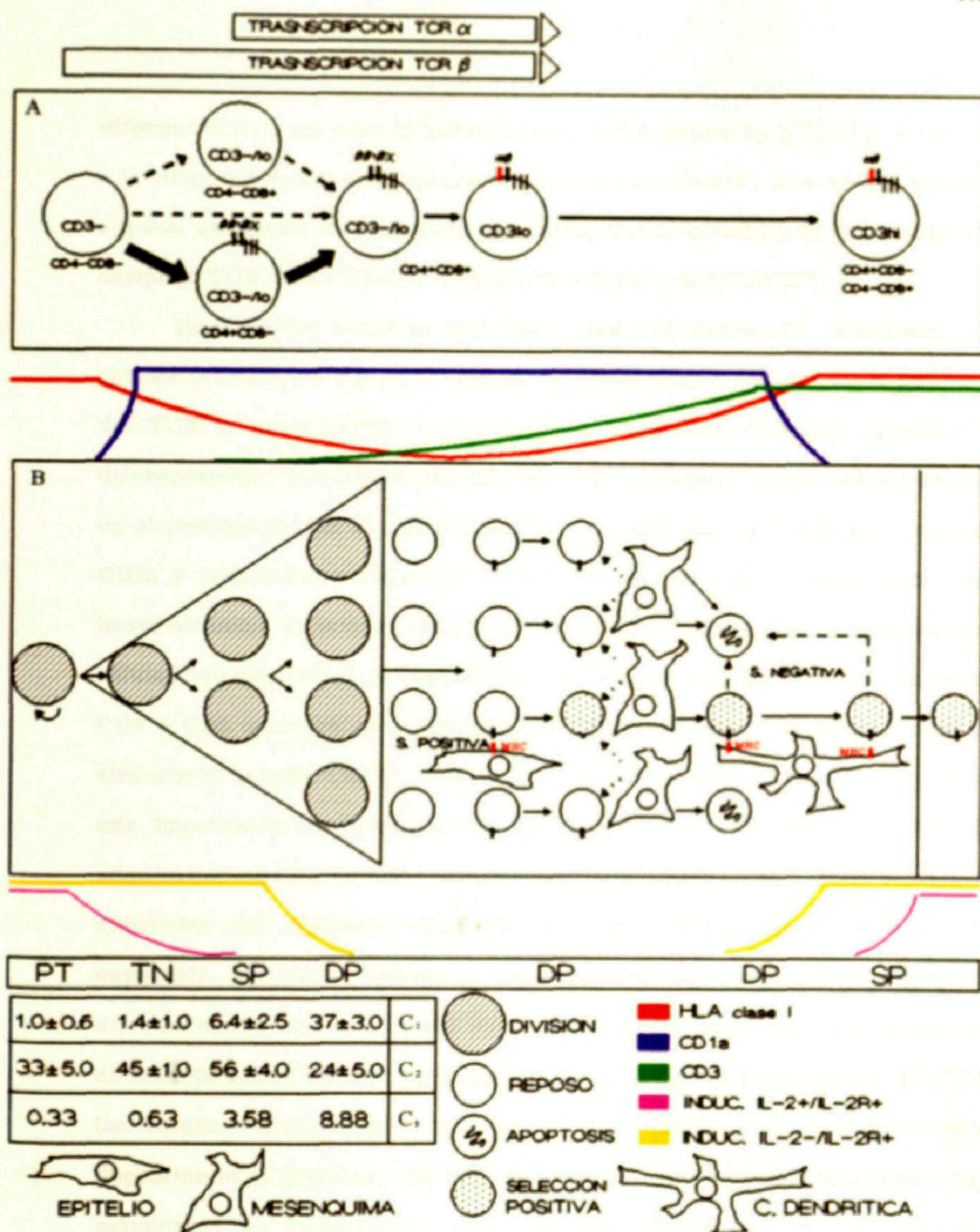


FIGURA 32

diferenciación, así como la inducibilidad de los genes de la IL-2 y del IL-2R a lo largo del desarrollo madurativo de los linfocitos T. El esquema general supone un orden de diferenciación programado previo a la expresión del complejo TCR-CD3: PT-TN-SP(CD4⁸⁻/CD4⁸⁺)-DP(CD4⁸⁺).

Durante los estadios más tempranos del desarrollo intratímico las células (CD1a³⁻⁴⁻⁸⁻RA^{HLA^A}) inician la transcripción del gen de la cadena β del TCR y experimentan un proceso de expansión limitado, previo a la diferenciación. Finalizada esta primera fase de expansión las células entran en el proceso inicial de diferenciación, que está asociado a la aparición de CD1a y concomitante disminución de HLA (estadio de diferenciación TN) hasta alcanzar el estadio CD1a³⁻⁴⁻⁸⁻RO^{HLA^{B/SUP}}, donde se encuentran las células con mayor tasa de división intratímica. La expresión de las moléculas CD4 ó CD8 ocurrirá en subpoblaciones transicionales diferentes antes de alcanzar el estadio CD4⁸⁺, siendo la subpoblación CD4⁸⁻ cuantitativamente más importante en humanos que la subpoblación alternativa CD4⁸⁺. La adquisición de CD8 (ó CD4) está asociada a la proliferación, mientras que la expresión del complejo TCR-CD3 será más tardía. Esta secuencia de expresión antigénica refleja el desarrollo de un programa autónomo de diferenciación tras la entrada de la célula en división. En este estadio de diferenciación (CD3⁴⁻⁸⁻), al igual que en su progenie inmediata (CD3⁴⁻⁸⁺), las células verifican si el reordenamiento (TCR β) ha sido productivo depositando el producto del gen reordenado, posiblemente asociado a una estructura no identificada (χ), en la superficie celular. El correcto ensamblaje de los complejos β/χ , probablemente con independencia de la especificidad V β , proporcionará acceso a la maduración iniciándose la transcripción del locus TCR α . Aquellas células que no expresen un complejo

β/α correcto serán eliminadas al no recibir la señal de diferenciación apropiada. Este proceso recuerda el de expresión (selección ?) del BCR durante el desarrollo ontogénico de los linfocitos B en la médula ósea, ya que durante el estadio pre-B la cadena μ_n se asocia en la superficie celular con una estructura similar a una cadena ligera ($V_{\text{pre-B}} - \lambda 5/14.1$).

Durante esta fase del desarrollo se inicia un proceso de ajuste de la fisiología celular, con el bloqueo sucesivo de los genes de la IL-2 y del IL-2R, cuya consecuencia final será la pérdida de funcionalidad del circuito IL-2/IL-2R en el estadio CD4⁺8⁺. Es interesante reseñar que a lo largo del proceso madurativo se produce una transición RA-R0-RA, lo cual sugiere que las isoformas del CD45 pueden desempeñar un papel relevante durante el desarrollo intratímico de las células T.

La adquisición de CD8 (ó CD4) representa el inicio del estadio de diferenciación CD4⁺8⁺ (donde se sitúan la mayoría de las células en división), con un descenso progresivo en el potencial generativo a medida que los timocitos se aproximan al punto de expresión del complejo TCR-CD3. En este sentido, la población CD1a⁺3⁺4⁺8⁺RO⁺HLA⁻/B⁺TCR α ⁻ β ⁺ (precursora inmediata de las células CD1a⁺3⁺4⁺8⁺RO⁺HLA⁻/B⁺TCR α ⁺ β ⁺ sobre las cuales van a operar los mecanismos de selección) constituye un estadio fundamental en el desarrollo intratímico de los linfocitos T, durante el cual se produce la fase de expansión final de los elementos precursores. Teniendo en cuenta que la división celular cesará antes de iniciarse los mecanismos de selección, la finalidad última del alto potencial generativo tímico será proporcionar un elevado número de precursores, que posibiliten la superación con éxito del estricto proceso de selección positiva por parte de un número adecuado de timocitos. Este proceso (selección positiva) es el mecanismo clave a través del

cual se controlará la producción de células T maduras, no sólo proporcionando acceso a la maduración, sino determinando la especialización funcional de las células seleccionadas. En ausencia de las señales de rescate apropiadas, proporcionadas por la interacción del receptor específico (TCR α/β) y de los correceptores CD8/CD4 con las moléculas del MHC (clase I ó II) expresadas por células especializadas del epitelio cortical, los tímocitos CD3⁺4⁺8⁺ serán eliminados a través de un mecanismo de muerte programada (apoptosis), mientras que las células seleccionadas positivamente incrementarán el nivel de expresión de HLA y TCR-CD3 e iniciarán el proceso de conversión en células fenotípicamente maduras (CD4⁺8⁺ ó CD4⁺8⁻). La inducción de apoptosis en las células no seleccionadas positivamente (muerte por ausencia de señal de rescate), no sería pues consecuencia de una programación interna previa de la célula, sino que parece ser una respuesta a determinadas señales ambientales. En este sentido, la existencia de un filtro de células mesenquimatosas que proporcionaría señales de apoptosis, exclusivamente en este estadio del desarrollo (CD3⁺4⁺8⁺), garantizaría la rápida eliminación de las células que no hayan recibido la señal de rescate apropiada. Estas no serían operativas en la células seleccionadas positivamente ya que la interacción de la porción variable del TCR α/β y de los correceptores CD4/CD8, con las moléculas MHC del epitelio cortical, inducirían en ellas un estado de resistencia/refractariedad a las señales inductoras de apoptosis liberadas por el microambiente tímico. Hay que resaltar el paralelismo de este proceso con el que opera en los linfocitos B, donde la activación vía BCR es necesaria para revertir la apoptosis inducida por el microambiente durante la selección del repertorio final (maduración de afinidad) en los centrocitos de los centros germinales del ganglio linfático.

La fase final del proceso de diferenciación no implica expansión clonal por lo que la transición DP-SP ocurre postmitóticamente. Durante esta fase se recupera la inducibilidad del gen del IL-2R, pero no la del gen de la IL-2. Este defecto en la secreción de IL-2 que presentan los timocitos medulares podría representar un mecanismo fisiológico implicado en el proceso de selección negativa, de forma que las señales iniciadas a través del receptor específico inducirían un proceso de activación abortiva que condicionaría la eliminación selectiva de las células con potencial autorreactivo.

Quisieramos resaltar que algunos aspectos del esquema propuesto implican nuevas ideas que pueden ser corroboradas experimentalmente en trabajos futuros, como son la naturaleza y significado de la cadena de 27 Kd asociada a TCR β en poblaciones precorticales, la activación de proteínas reguladoras de la apoptosis en la población cortical, y la regulación negativa del crecimiento en la subpoblación CD3⁺4⁺8⁻, cuyas células en división (obtenidas en gran cantidad por procesos simples) representan un material único en el organismo que permite estudiar *ex vivo* la regulación y características de los procesos de proliferación (espontánea) en células no transformadas.

1. The first step in the process of the development of a new product is the identification of a market need. This is done by conducting market research, which involves gathering information about the needs and wants of potential customers. This information is then used to develop a product that meets these needs and wants.

2. The second step is the development of a business plan. This plan outlines the company's goals, objectives, and the strategies that will be used to achieve them. It also includes a financial forecast, which shows the expected revenue and expenses of the company over a period of time.

3. The third step is the development of a prototype. This is a preliminary version of the product that is used to test the design and to gather feedback from potential customers. The prototype is usually made of a material that is easy to work with, such as wood or plastic, and it is usually made in a small quantity.

4. The fourth step is the production of the final product. This is done by using the information from the prototype and the business plan to create a production plan. This plan outlines the steps that will be taken to produce the product, including the selection of materials, the hiring of workers, and the setting up of a production line.

CONCLUSIONES

5. The final step is the distribution of the product. This is done by using the information from the business plan to develop a distribution plan. This plan outlines the steps that will be taken to get the product to the customers, including the selection of a distribution channel and the setting up of a distribution network.

1. En t mo humano postnatal un porcentaje significativo de las células están en división ($11,5 \pm 1,8\%$). La mayoría de las células en fases S/G₂/M expresan CD1a y son CD3 negativas, lo cual indica que la fase de expansión celular ocurre preferentemente durante los estadios iniciales del desarrollo intratímico.
2. El punto de máxima división intratímica corresponde al estadio inicial de disminución de la expresión de HLA, ya que la mayoría de las células en división expresan niveles intermedios/altos de HLA (HLA^{B/SUP}) y son CD3⁻.
3. La identificación y aislamiento de una subpoblación precursora (no descrita en humanos) CD1a⁺3⁻4⁺8⁻ numéricamente significativa, que expresa niveles de HLA intermedios/altos y que contiene la mayor tasa de células en división dentro de las subpoblaciones aisladas, confirma la presencia de una importante población precortical en proceso de expansión.
4. El estudio del ciclo celular en diferentes subpoblaciones tímicas inmaduras (CD3⁻) sugiere que durante los estadios más tempranos del desarrollo (PT), las células experimentan un proceso de expansión limitado previo a la diferenciación, mientras que en los estadios precorticales intermedios la proliferación se acomp a a de diferenciación.
5. El proceso de diferenciación espontáneo (*in vitro*) que experimenta la subpoblación CD3⁻4⁺8⁻ (\sim CD3^B4⁺8⁺), remeda con alta probabilidad uno de

los pasos fundamentales del desarrollo intratímico, lo que confirma su naturaleza de estadio precortical inmediato.

6. Los estudios realizados en presencia de agentes antimitóticos confirman que durante este estadio del desarrollo la adquisición de CD8 está asociada a la proliferación, mientras que la expresión del complejo TCR-CD3 es más tardía (probablemente postmitótica). Esta secuencia de expresión antigénica (CD8 y TCR-CD3) refleja el desarrollo de un programa autónomo de diferenciación tras la entrada de la célula en división.
7. La población CD4⁺8⁺ contiene la mayoría de las células en división (65%), no obstante esta población presenta la menor tasa de división en relación a las poblaciones precedentes, indicando un descenso progresivo en el potencial generativo a medida que los timocitos se aproximan al punto de expresión del complejo TCR-CD3.
8. En conjunto estos resultados revelan que los mecanismos de selección ocurren postmitóticamente, y que la finalidad última del alto potencial generativo tímico es el aporte de un elevado número de precursores, requisito necesario dado lo estricto de los procesos de selección (positiva/negativa) del repertorio.
9. La caracterización fenotípica de las subpoblaciones precorticales aisladas y el estudio *in vitro* de las variaciones fenotípicas espontáneas sugieren que el orden de diferenciación previo a la expresión del

complejo TCR-CD3 es: PT-TN-SP(CD4⁺8⁻/CD4⁺8⁺)-DP, siendo la subpoblación transicional CD4⁺8⁻ cuantitativamente más importante en humanos que la población alternativa CD4⁺8⁺.

10. A lo largo del proceso madurativo se evidencia una transición RA-RO-RA, lo cual sugiere que las isoformas de la molécula CD45 pueden desempeñar un papel importante en el desarrollo intratímico de los linfocitos T, y descarta el papel atribuido a las células RA⁺ como exclusivo linaje generativo intratímico.
11. Durante la transición entre los estadios CD3⁺4⁺8⁻ y CD3⁺4⁺8⁺ se inicia un proceso de pérdida de funcionalidad del circuito IL-2/IL-2R cuya consecuencia final es el bloqueo de la inducibilidad de ambos genes en el estadio cortical (CD4⁺8⁺).
12. La IL-2 es capaz de promover respuestas proliferativas en poblaciones tímicas inmaduras. Durante este proceso las células adquieren marcadores característicos de estadios más avanzados del desarrollo, aunque el patrón de expresión antigénica no refleja el observado durante la diferenciación fisiológica. En presencia de células estromales de origen mesenquimatoso la secuencia de expresión antigénica remeda más la transición fisiológica, lo cual sugiere que estas células pueden regular determinados aspectos de la fase temprana del desarrollo.
13. La población cortical originada *in vitro* y su homóloga obtenida *ex vivo* son sensibles a señales inductoras de apoptosis proporcionadas por una

línea mesenquimatosa derivada de timo humano (PG/85) obtenida en nuestro laboratorio.

14. La singularidad del fenómeno anterior permite deducir que determinados componentes del mesenquima tímico participan en la eliminación de las células no seleccionadas positivamente (muerte por ausencia de señal de rescate), y que el proceso de selección positiva supone la adquisición (vía TCR) de señales que contrarrestan el posible efecto inductor de apoptosis del microambiente tímico.
15. Aunque son necesarios estudios posteriores más amplios, la posible expresión de TCR β (en ausencia de TCR α) asociada a una estructura de 27 Kd en la superficie de los timocitos CD3⁺4⁺8⁺ y en su progenie inmediata (CD3⁺4⁺8⁺), confirmaría el carácter único de estas poblaciones, en relación con los eventos iniciales de los procesos de selección.

Parte dei capitoli di cui si è parlato nel capitolo precedente
che si riferiscono alla storia della città di Napoli.

1. Definizione di città e di metropoli. La città è un
insieme di abitatori che vivono in un luogo determinato
e che sono sottoposti a una autorità comune. La metropoli
è una città che ha sotto la sua dipendenza altre città o
villaggi.

2. La città di Napoli. La città di Napoli è una
metropoli che ha sotto la sua dipendenza molte città e
villaggi. La città di Napoli è una delle più antiche
città del mondo. La città di Napoli è una delle più
grandi città del mondo.

APENDICE

Parte del contenido de esta tesis está publicado o enviado a las revistas internacionales que se detallan a continuación:

1. **Delimitation of the Proliferative Stages in the Human Thymus indicates that Cell Expansion Occurs before the Expression of CD3 (T Cell Receptor).** Luis Alvarez-Vallina, Africa González, Francisco Gambón, Miguel Kreisler y Fernando Díaz-Espada. **J. IMMUNOL.** 150:8. 1993.
2. **In vitro Differentiation of Human CD3⁺4⁺8⁻: Kinetics of CD8 and T Cell Antigen Receptor Expression.** Luis Alvarez-Vallina y Fernando Díaz-Espada. **EUR. J. IMMUNOL.** (enviado para su publicación).

1. van der Horst, G. 1953. *De Nederlandse vogels*. — Amsterdam: De Vrije Pers.
2. Gmelin, J. 1773. *Index avium*. — Amsterdam: Apud J. Neumeijer.
3. Gmelin, J. 1773. *Index avium*. — Amsterdam: Apud J. Neumeijer.
4. Gmelin, J. 1773. *Index avium*. — Amsterdam: Apud J. Neumeijer.
5. Gmelin, J. 1773. *Index avium*. — Amsterdam: Apud J. Neumeijer.
6. Gmelin, J. 1773. *Index avium*. — Amsterdam: Apud J. Neumeijer.
7. Gmelin, J. 1773. *Index avium*. — Amsterdam: Apud J. Neumeijer.
8. Gmelin, J. 1773. *Index avium*. — Amsterdam: Apud J. Neumeijer.
9. Gmelin, J. 1773. *Index avium*. — Amsterdam: Apud J. Neumeijer.
10. Gmelin, J. 1773. *Index avium*. — Amsterdam: Apud J. Neumeijer.

BIBLIOGRAFIA

1. Gmelin, J. 1773. *Index avium*. — Amsterdam: Apud J. Neumeijer.
2. Gmelin, J. 1773. *Index avium*. — Amsterdam: Apud J. Neumeijer.
3. Gmelin, J. 1773. *Index avium*. — Amsterdam: Apud J. Neumeijer.
4. Gmelin, J. 1773. *Index avium*. — Amsterdam: Apud J. Neumeijer.
5. Gmelin, J. 1773. *Index avium*. — Amsterdam: Apud J. Neumeijer.
6. Gmelin, J. 1773. *Index avium*. — Amsterdam: Apud J. Neumeijer.
7. Gmelin, J. 1773. *Index avium*. — Amsterdam: Apud J. Neumeijer.
8. Gmelin, J. 1773. *Index avium*. — Amsterdam: Apud J. Neumeijer.
9. Gmelin, J. 1773. *Index avium*. — Amsterdam: Apud J. Neumeijer.
10. Gmelin, J. 1773. *Index avium*. — Amsterdam: Apud J. Neumeijer.

- cell receptor/CD3 complex: a dynamic protein ensemble. *Annu. Rev. Immunol.* 6:629.
11. Ashwell, J. D. y Klausner, R. D. 1990. Genetic and mutational analysis of the T-cell antigen receptor. *Annu. Rev. Immunol.* 8:139.
 12. Kappes, D. J. y Tonegawa, S. 1991. Surface expression of alternative forms of the TCR/CD3 complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88:10619.
 13. Alarcón, B., Ley, S. C., Sánchez-Madrid, F., Blumberg, R. S., Ju, S. T., Fresno, M. y Terhorst, C. 1991. The CD3- γ and CD3- δ subunits of the T cell antigen receptor can be expressed within distinct functional TCR/CD3 complexes. *EMBO J.* 10:903.
 14. Buferne, M., Luton, F., Letouneur, F., Hoeveler, A., Covez, D., Barad, M., Malissen, B., Schmitt-Verhulst, A-M. y Boyer, C. 1992. Role of CD3 δ in surface expression of the T cell antigen receptor/CD3 complex and in activation for killing analyzed with CD3 δ negative cytolytic T lymphocyte variant. *J. Immunol.* 148:657.
 15. Geisler, C. 1992. Failure to synthesize the CD3- γ chain. Consequences for T cell antigen receptor assembly, processing, and expression. *J. Immunol.* 148:2437.
 16. Davis, M. M. y Bjorkman, P. J. 1988. T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature.* 334:395.
 17. Marrack, P. y Kappler, J. 1988. The T cell repertoire for antigen and MHC. *Immunol. Today.* 9:308.
 18. Rothenberg, E.V. 1992. The development of functionally responsive T cells. *Adv. Immunol.* 51:85.
 19. Kosco, M. H. 1991. Antigen presentation to B cells. *Current Op.*

- Immunol. 3:336.
20. Schwartz, R. H. 1985. T-lymphocyte recognition of antigen in association with gene products of the major histocompatibility complex. *Annu. Rev. Immunol.* 3:237.
 21. Brown, J. H., Jardetzky, T., Saper, M. A., Samraoui, B., Bjorkman, P. J. y Wiley, D. C. 1988. A hypothetical model of the foreign antigen binding site of class II histocompatibility molecules. *Nature.* 332:845.
 22. Townsend, A. y Bodmer, H. 1989. Antigen recognition by class I-restricted T lymphocytes. *Annu. Rev. Immunol.* 7:601.
 23. Braciale, T. J., Morrison, L. A., Sweetser, M. T., Sambrook, J., Gething, M. J. y Braciale, V. L. 1987. Antigen presentation pathways to class I and class II MHC restricted T lymphocytes. *Immunol. Rev.* 88:95.
 24. Rothbard, J. B. y Geftter, M. L. 1991. Interactions between immunogenic peptides and MHC proteins. *Annu. Rev. Immunol.* 9:527.
 25. Monaco, J. J. 1992. A molecular model of MHC class-I-restricted antigen processing. *Immunol. Today.* 13:173.
 26. Neefjes, J. J. y Hidde, L. P. 1992. Intracellular transport of MHC class II molecules. *Immunol. Today.* 13:179.
 27. Yewdell, J. W. y Bennik, J. R. 1992. Cell biology of antigen processing and presentation to major histocompatibility complex class I molecule-restricted T lymphocytes. *Adv. Immunol.* 52:1.
 28. Bjorkman, P. J., Saper, M. A., Samraoui, B., Bennett, W. S., Strominger, J. L. y Wiley, D. C. 1987. Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature.* 329:506.

29. Bjorkman, P. J., Saper, M. A., Samraoui, B., Bennett, W. S., Strominger, J. L. y Wiley, D. C. 1987. The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. *Nature*. 329:512.
30. Brown, J. M., Jardetzky, T. S., Gorga, J. C., Stern, L. J., Urban, R. G., Strominger, J. L. y Wiley, D. C. 1993. Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature*. 364: 33.
31. Amit, A. G., Mariuzza, R. A., Phillips, S. E. V. y Poljak, R. J. 1986. Three-dimensional structure of an antigen-antibody complex at 2.8 Å resolution. *Science*. 233:747.
32. Chothia, C., Boswell, D. R. y Lesk, A. M. 1988. The outline of the T-cell alpha beta receptor. *EMBO J.* 7:3745.
33. Claverie, J-M, Prochnicka-Chalufour, A. y Bourgueleret, L. 1989. Implications of a Fab-like structure for the T-cell receptor. *Immunol. Today*. 10:10.
34. Altman, A., Coggeshall, M. y Mustelin, T. 1990. Molecular events mediating T cell activation. *Adv. Immunol.* 48:227.
35. Doyle, C. y Strominger, J. L. 1987. Interaction between CD4 and class II MHC molecules mediates cell adhesion. *Nature*. 330:256.
36. Norment, A. M., Salter, R. D., Parham, P., Engelhard, V. H. y Litman, D. R. 1988. Cell-cell adhesion mediated by CD8 and MHC class I molecules. *Nature*. 336:79.
37. Thomas, M. L. 1989. The leukocyte common antigen family. *Annu. Rev. Immunol.* 7:339.
38. Swain, S. 1983. T cell subsets and the recognition of MHC class.

- Immunol. Rev. 74:195.
39. Veillette, A., Bookman, M. A., Horak, E. V. y Bolen, J. B. 1988. The CD4 and CD8 T cell surface antigens are associated with the internal membrane tyrosine-protein kinase p56^{lck}. *Cell*. 55:301.
 40. Rudd, E. R., Trevillyan, J. M., Dasgupta, J. D., Wong, L. L. y Schlossman, S. 1988. The CD4 receptor is complexed in detergent lysates to a protein-tyrosine kinase (pp58) from human T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 85:5190.
 41. Janeway, C. A. y Golstein, P. 1993. Lymphocyte activation and effector functions. *Current Op. Immunol*. 5:313.
 42. Nishizuka, Y. 1984. The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. *Nature*. 308:693.
 43. Imboden, J. B. y Stobo, J. D. 1985. Transmembrane signaling by the T cell antigen receptor. Perturbation of the T3-antigen receptor complex generates inositol phosphates and releases calcium ions from intracellular stores. *J. Exp. Med*. 161:446.
 44. Malissen, B. y Schmitt-Verhulst, A-M. 1993. Transmembrane signalling through the T-cell-receptor-CD3 complex. *Current Op. Immunol*. 5:324.
 45. Mustelin, T., Coggeshall, K. M. y Altman, A. 1989. Rapid activation of the T-cell tyrosine protein kinase pp56^{lck} by the CD45 phosphotyrosine phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 86:6302.
 46. Ullman, K. S., Northrop, J. P., Verweij, C. L. y Crabtree, G. R. 1990. Transmission of signals from the T lymphocyte antigen receptor to the genes responsible for cell proliferation and immune function: the missing link. *Annu. Rev. Immunol*. 8:421.

47. Taniguchi, T. y Minami, Y. 1993. The IL-2/IL-2 receptor system: a current overview. *Cell*. 73:5.
48. Springer, T. A. 1990. Adhesion receptors of the immune system. *Nature*. 346:4254.
49. De Franco, A. L. 1991. Between B cells and T cells. *Nature*. 351:603.
50. Jenkins, M.K., Ashwell, J. D., Schwartz, R. H. 1988. Allogenic non-T spleen cells restore the responsiveness of normal T cell clones stimulated with antigen and chemically modified antigen-presenting cells. *J. Immunol*. 140:3324.
51. Mueller, D. L., Jenkins, M. K. y Schwartz, R. H. 1989. Clonal expansion versus functional clonal inactivation: A costimulatory signalling pathway determines the outcome of T cell antigen receptor occupancy. *Annu. Rev. Immunol*. 7:445.
52. Sprent, J., Lo, D., Gao, E-K y Ron, Y. 1988. The cell selection in the thymus. *Immunol. Rev*. 101:173.
53. Ritter, M. A. y Crispe, I. N. 1992. en *The Thymus*. Rickwood, D. y Male, D. eds. Oxford University Press, p. 9.
54. van Ewijk, W. 1991. T-cell differentiation is influenced by thymic microenvironments. *Annu. Rev. Immunol*. 9:591.
55. Kendall, M. D. 1984. Have we understanding the importance of the adult human thymus?. *Experientia*. 40:1181.
56. Scollay, R., Smith, J. y Stauffer, V. 1986. Dynamics of early T cells: prothymocyte migration and proliferation in the adult mouse thymus. *Immunol. Rev*. 91:129.
57. Kurtzberg, J., Denning, S. M., Nycum, L. M., Singer, K. H. y Haynes, B. F. 1989. Immature human thymocytes can be driven to

- differentiate into nonlymphoid lineages by cytokines from thymic epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 86:7575.
58. Ezine, S., Papiernik M. y Lepault, F. 1991. Persistence of stem cell activity within the murine thymus after transfer of a bone marrow fraction enriched in CFU-S. *Int. Immunol.* 126:1120.
 59. Shortman, K., Egerton, M., Spangrude, G. J. y Scollay, R. 1990. The generation and fate of thymocytes. *Semin. Immunol.* 2:3.
 60. Poste, M. E. y Olson, I. A. 1973. An investigation of the sites of mitotic activity in the guinea-pig thymus using autoradiography and colcemid-induced mitotic arrest. *Immunology*. 24:691.
 61. Scollay, R., Butcher, E. C. y Weissman, I. L. 1980. Thymus cell migration. Quantitative aspects of cellular traffic from the thymus to the periphery in mice. *Eur. J. Immunol.* 10:210.
 62. Golstein, P., Ojcius, D. M. y Young, D-E. 1991. Cell death mechanisms and the immune system. *Immunol. Rev.* 121:29.
 63. Cohen, J. J. 1991. Programmed cell death in the immune system. *Adv. Immunol.* 50:55.
 64. Jim, P-J., Clayton, L. K., Howard, F. D., Koyasu, S., Sieh, M., Steinbrich, R., Tarr, G. E. y Reinherz, E. L. 1990. Molecular cloning of the CD3 η subunit identifies a CD3 ζ -related product in thymus-derived cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 87:3319.
 65. Reinherz, E. L., Kung, P. C., Goldstein, G., Levey, R. H. y Schlossman, S. F. 1980. Discrete stages of human intrathymic differentiation: Analysis of normal thymocytes and leukemic lymphoblasts of T-cell lineage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 77:1588.
 66. Gambón, F., Kreisler, M. y F. Díaz-Espada. 1988. Correlated

- expression of surface antigens in human thymocytes. Evidence of class I modulation in thymic maturation. *Eur. J. Immunol.* 18:153.
67. Lanier, L. L., Allison, J. P. y Phillips, J. H. 1986. Correlation of cell surface antigen expression on human thymocytes by multi-color flow cytometry analysis: implication for differentiation. *J. Immunol.* 137:2501.
 68. Guidos, C. J., Weissman, I. L. y Adkins, B. 1989. Intrathymic maturation of murine T lymphocytes from CD8⁺ precursors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86:7542.
 69. Calabi, F. y Bradbury, A. 1991. The CD1 system. *Tissue Antigens.* 37:1.
 70. Nikolic-Zugic, J. y Moore, M. W. 1989. T cell receptor expression on immature thymocytes with in vivo and in vitro precursor potential. *Eur. J. Immunol.* 19:1957.
 71. Fowlkes, B. J. y Pardoll, D. M. 1989. Molecular and cellular events of T cell development. *Adv. Immunol.* 44:207.
 72. von Boehmer, H. 1990. Developmental biology of T cells in T cell-receptor transgenic mice. *Annu. Rev. Immunol.* 8:531.
 73. Uematsu, Y., Ryser, S., Dembic, Z., Borgulya, P., Krimpenfort, P., Berns, A., von Boehmer, H. y Steinmetz, M. 1988. In transgenic mice the introduced functional T cell receptor β gene prevents expression of endogenous β genes. *Cell.* 52:831.
 74. Rothenberg, E. V. 1990. Death and transfiguration of cortical thymocytes: a reconsideration. *Immunol. Today.* 11:116.
 75. Pardoll, D. y Carrera, A. 1992. Thymic selection. *Current Op. Immunol.* 4:162.

76. Vollger, L. W., Tuck, D. T., Springer, T. A., Haynes, B. F. y Singer, K. H. 1987. Thymocyte binding to human thymic epithelial cells is inhibited by monoclonal antibodies to CD2 and LFA-3 antigens. *J. Immunol.* 138:358.
77. Nonoyama, S., Nakayama, M., Shiohara, T. y Yata, J. Only dull CD3⁺ thymocytes bind to thymic epithelial cells. The binding is elicited by both CD2/LFA-3 and LFA-1/ICAM-1 interactions. *Eur. J. Immunol.* 19:1631.
78. von Boehmer, H., Kisielow, P., Kishi, H., Scott, B., Borgulya, P. y Sia Teh, H. 1989. The expression of CD4 and CD8 accessory molecules on mature T cells is not random but correlates with the specificity of the $\alpha\beta$ receptor for antigen. *Immunol. Rev.* 109:143.
79. Benoist, C. y Mathis, D. 1989. Positive selection of the T cell repertoire: where and when does it occur?. *Cell.* 58:1027.
80. Berg, L. J., Fazekas de St. Groth, B., Pullen, A. M. y M. Davis, M. 1989. Phenotypic differences between $\alpha\beta$ versus β T-cell receptor transgenic mice undergoing negative selection. *Nature.* 340:559.
81. Vurmanovic, S., Grandea, A. G., Faas, S. J., Knowles, B. B. y Bevan, M. J. 1992. Positive selection of T-lymphocytes induced by intrathymic injection of a thymic epithelial cell line. *Nature.* 359:729
82. Kendall, M. D. 1990. en *Thymus update* (vol. 3). Kendall, M. D. y Ritter, M. A. eds. Harwood Academic Publishers, p. 53.
83. Finkel, T. H., Kubo, R. T. y Cambier, J. C. 1991. T-cell development and transmembrane signaling: changing biological responses through an unchanging receptor. *Immunol. Today.* 12:79.
84. Marrack, P., McCormack, J. y Kappler, J. 1989. Presentation of

- antigen, foreign major histocompatibility complex proteins and self by thymus cortical epithelium. *Nature*. 338:503.
85. Sha, W. C., Nelson, C. A., Newberry, R. D., Pullen, J. K., Pease, L. R., Russell, J. H. y Loh, D-Y. 1990. Positive selection of transgenic receptor-bearing thymocytes by K^b antigen is altered by K^b mutations that involve peptide binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 87:6186.
 86. Nikolic-Zugic, J. y Bevan, M. J. 1988. Thymocytes expressing CD8 differentiate into $CD4^+$ cells following intrathymic injection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 85:8633.
 87. Lo, D. y Sprent, J. 1986. Identity of cells that imprint H-2-restricted T-cell specificity in the thymus. *Nature*. 319:672.
 88. Kruisbeek, A. M. 1993. Development of $\alpha\beta$ T cells. *C. Op. Immunol.* 5:227.
 89. Nikolic-Zugic, J. y Bevan, M. J. 1990. Role of self-peptides in positively selecting the T-cell repertoire. *Nature*. 344:65.
 90. Berg, L. J., Frank, G. D. y Davis, M. M. 1990. The effects of MHC gene dosage and allelic variation on T cell receptor selection. *Cell*. 60:1043.
 91. Schild, H., Rotzschke, O., Kalbacher, H, y Rammensee, H-G. 1990. Limit of T cell tolerance to self proteins by peptide presentation. *Science*. 247:1587.
 92. Nikolic-Zugic, J. 1991. Phenotypic and functional stages in the intrathymic development of $\alpha\beta$ T cells. *Immunol. Today*. 12:65.
 93. Mc Michael, A. J., Pilch, J. R., Galfre, G., Mason, D. Y., Fabre, J. W. y Milstein, C. 1979. A human thymocyte antigen defined by a

- hybrid myeloma monoclonal antibody. *Eur. J. Immunol.* 9:205.
94. Mc Michael, A. J. y Goth, F. M. 1987. T cell antigens: new and previously defined clusters. en *Leucocyte Typing III. White Cell Differentiation Antigens*. McMichael, A. J. eds. Oxford University Press, p. 31.
 95. June, C. H., Ledbetter, J. A., Rabinovitch, P. S., Hellstrom, K. E. y Hellstrom, I. 1987. Calcium mobilization and enhanced natural killer function in large granular lymphocytes result from cross-linking the CD2 E-rosette CD16 Fc-receptor. en *Leucocyte Typing III. White Cell Differentiation Antigens*. McMichael, A. J. eds. Oxford University Press, p. 127.
 96. Spits, H., Yssel, H., Leeuwenberg, J. y De Vries, J. E. 1985. Antigen-specific cytotoxic T cell and antigen-specific proliferating T cell clones can be induced to cytolytic activity by monoclonal antibodies against T3. *Eur. J. Immunol.* 15: 88.
 97. Carrera, A. C., Sánchez-Madrid, F., López-Botet, M., Bernabeu, C. y De Landázury, M. O. 1987. Involment of the CD4 molecule in a post-activation event on T cell proliferation. *Eur. J. Immunol.* 17:179.
 98. Malissen, B., Rebai, N., Liabeuf, A. y Mawas, C. 1982. Human cytotoxic T cell structures associated with expression of cytotoxicity. Analysis at the clonal cell level of the cytotoxicity inhibiting effect of 7 monoclonal antibodies. *Eur. J. Immunol.* 12:739.
 99. López-Botet, M., Moretta, A., Lowenthal, J., Acolli, R., Pantaleo, G. y Moretta, L. 1986. Characterization of monoclonal antibodies directed against the human interleukin 2 receptor. *Inmunología*. 5:46.
 100. Cobbold, S., Hale, G. y Waldman, H. 1987. Non-lineage, LFA-1

- family, and leucocyte common antigens: new and previously defined clusters. en **Leucocyte Typing III. White Cell Differentiation Antigens**. McMichael, A. J. eds. Oxford University Press, p. 788.
101. Terry, L. A., Brown, M. H. y Beverly, P. C. L. 1988. The monoclonal, UCHL1, recognizes a 180,000 MW component of the human leucocyte-common antigen, CD45. **Immunology**. 64:331.
 102. Sánchez-Madrid, F., Krensky, A. M., Wave, C. F., Robbins, E., Strominger, J. L., Burakoff, S. J. y Springer, T. A. 1982. Three distinct antigens associated with human T-lymphocyte mediated cytotoxicity, LFA-1, LFA-2 and LFA-3. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. 79:7489.
 103. Barnstable, C. J., Bodmer, W. F., Brown, G., Galfré, G., Milstein, C., Williams, A. F. y Zeigler, A. 1978. Production of monoclonal antibodies to group A erythrocytes, HLA and other human cell surface antigens: new tools for genetic analysis. **Cell**. 14:9
 104. Quaranta, V., Indiveri, F., Glassy, M. C., Nag, A., Russo, C., Molinaro, G. A., Pellegrino, M. A. y Ferrone, S. 1980. Serological, functional and immunochemical characterization of monoclonal antibody (Mo Ab Q2/70) to human Ia-like antigens. **Human Immunol**. 3:211.
 105. American type culture collection catalogue of cell lines and hybridomas, 7th edition. 1992. Hay, R., Caputo, J., Chen, T. R., Macy, M., McClintock, P. y Reid, Y. eds. p. 418.
 106. Rabinovitch, P. S., Torres, R. M. y Engel, D. 1986. Simultaneous cell cycle analysis and two-color surface immunofluorescence using 7-amino-actinomycin D and single laser excitation: application to study of cell activation and the cell cycle of murine Ly-1 B cells. **J. Immunol**.

- 136: 2769.
107. Sasaki, D. T., Dumas, S. E. y Engleman, E. G. 1987. Discrimination of viable and non-viable cells using propidium iodide in two color immunofluorescence. *Cytometry*. 8:413.
 108. Markwell, M. A. 1982. A new solid-state reagent to iodinate proteins. Conditions for the efficient labeling of antiserum. *Anal Biochem*. 125:427.
 109. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227:680.
 110. Bonner, W. M. y Laskey, R. A. 1974. A film detection method for tritium-labeled proteins and nucleic acids in polyacrylamide gels. *Eur. J. Biochem*. 46:83
 111. Nakajima-Iijima, S., Hamada, H., Reddy, P. y Kakunaga, T. 1985. Molecular structure of the human cytoplasmic β -actin gene: interspecies homology of sequences in the introns. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 82:6133.
 112. Plaza, A., Kono, D. H. y Theofilopoulos, N. 1991. New human V β genes and polymorphic variants. *J. Immunol*. 147:4360.
 113. Terstappen, L. W., Huang, S. y Picker, L. J. 1992. Flow cytometric assessment of human T-cell differentiation in human thymus and bone marrow. *Blood*. 79:666.
 114. Gillitzer, R. y Pilarski, L. M. 1990. In situ localization of CD45 isoforms in the human thymus indicates a medullary location for the thymic generative lineage. *J. Immunol*. 144:66.
 115. González-Fernández, A., Díaz-Espada, F., Kreisler, M. y Gambón Deza, F. 1991. Proliferative responses induced by the activation of

- protein kinase C during the development of human T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 21:115.
116. Penit, C. 1986. In vivo thymocyte maturation. BUdR labeling of cycling thymocytes and phenotype analysis of their progenie support the single lineage model. *J. Immunol.* 137:2115.
 117. Erusalimsky, J. D., Gilmore, D. y Milstein, C. 1987. The induction of class I HLA by interferon- α is independent of the cell cycle, but the expression is enhanced by a G_1/S block. *Eur. J. Immunol.* 17:623.
 118. Carding, S. R., Hayday, A. C. y Bottomly, K. 1991. Cytokines in T-cell development. *Immunol. Today.* 12:239.
 119. Blumberg, P. M. 1988. Protein kinase C as the receptor for the phorbol tumor promoters: sixth rhoads memorial award lecture. *Cancer Research.* 48:1.
 120. American type culture collection catalogue of cell lines and hybridomas, 7th edition. 1992. Hay, R., Caputo, J., Chen, T. R., Macy, M., McClintock, P. y Reid, Y. eds. p. 207 y 272.
 121. Ormerod, M. G., Collins, M. K., Rodriguez-Tarduchy, G. y Robertson, D. 1992. Apoptosis in interleukin-3-dependent haematopoietic cells. Quantification by two flow cytometric methods. *J. Immunol. Methods.* 153:57.
 122. Milstein, C., Calabi, F., Jarvis, J. M., Kefford, R., Martin, L. y Migone, N. 1987. CD1: A family of MHC-related genes which do not map in chromosome 6. en *Leucocyte Typing III. White Cell Differentiation Antigens.* McMichael, A. J. eds. Oxford University Press, p. 882.
 123. Spits, H., Borst, J., Tax, W., Capel, P. J. A., Terhost, C. y De

- Vries, J. E. Characterization of a monoclonal antibody (WT-31) that recognizes a common epitope on the human T cell receptor for antigen. *J. Immunol.* 135:1922.
124. Janossy, G., Bofill, M., Trejdosiewicz, L. K. y Willcox, H. N. A. 1986. Cellular differentiation of lymphoid subpopulations and their microenvironments in the human thymus. "The human thymus histophysiology and pathology". *Current Topics in Pathology.* 75:89.
 125. Egerton, M., Scollay, R. y Shortman, K. 1990. Kinetics of mature T-cell development in the thymus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87:2579.
 126. Shortman, K., Vremec, D. y Egerton, M. 1991. The kinetics of T cell antigen receptor expression by subgroups of CD4⁺8⁺ thymocytes: Delineation of CD4⁺8⁺3⁺ thymocytes as post-selection intermediates leading to mature T cells. *J. Exp. Med.* 173:323.
 127. Hori, T., Cupp, J., Wrighton, N., Lee, F. y Spits, H. 1991. Identification of a novel human thymocyte subset with a phenotype of CD3⁻CD4⁺CD8 α ⁺B⁻. *J. Immunol.* 146:4078.
 128. Bluestone, J. A., Pardoll, D., Sharrow, S. O. y Fowkes, B. J. 1987. Characterization of murine thymocytes with CD3-associated T-cell receptor structures. *Nature.* 326:82.
 129. Matsumoto, K., Yoshikai, Y., Matsuzaki, G., Asano, T. y Nomoto, K. 1989. A novel CD3⁻J11d⁺ subset of CD4⁺CD8⁻ cells repopulating thymus in radiation bone marrow chimeras. *Eur. J. Immunol.* 19:1203.
 130. Hugo, P., Wanders, G. A., Scollay, R., Shortman, K. y Boyd, R. L. 1990. Ontogeny of a novel CD4⁺CD8⁻CD3⁻ thymocyte subpopulation: a comparison with CD4⁻CD8⁺CD3⁻ thymocytes. *Int. Immunol.* 2:209.
 131. MacDonald, H. R., Budd, R. C. y Howe, R. C. 1988. A CD3⁻ subset

- of CD4⁺8⁺ thymocytes: a rapidly cycling intermediate in the generation of CD4⁺8⁺ cells. *Eur. J. Immunol.* 18:519.
132. Shortman, K., Wilson, A., Egerton, M., Pearce, M. y Scollay, R. 1988. Immature CD4⁺CD8⁺ murine thymocytes. *Cell. Immunol.* 113:462.
 133. Wu., L., Scollay, R., Egerton, M., Pearce, M., Spangrude, G. J. y Shortman, K. 1991. CD4 expressed on earliest T-lineage precursors cells in the adult murine thymus. *Nature.* 349:71.
 134. Blue, M-L., Levine, H., Daley, J. F., Branton, K. R. y Schlossman, S. F. 1989. Expression of CD1 and class I MHC antigens by human thymocytes. *J. Immunol.* 142:2714.
 135. Merckenschlager, M. y Fisher, A. G. 1992. Human postnatal thymocytes generate phenotypically immature CD3^{dim}, CD5^{dim}, CD1a^{bright} progeny in organ culture. *J. Immunol.* 148:1012.
 136. Kraft, D. L., Weissman, I. L. y Waller, E. K. 1993. Differentiation of CD3⁺4⁺8⁺ thymocytes in vivo: characterization of a CD3⁺4⁺8⁺ intermediate. *J. Exp. Med.* 178:265.
 137. Penit, C., Vasseur, F. y Papiernik, M. 1988. In vivo dynamics of CD4⁺CD8⁺ thymocytes. Proliferation, renewal and differentiation of different cell subsets studied by DNA biosynthetic labeling and surface antigen detection. *Eur. J. Immunol.* 18:1343.
 138. Penit, C. y Vasseur, F. 1988. Sequential events in thymocyte differentiation and thymus regeneration revealed by a combination of bromodeoxyuridine DNA labelling and antimitotic drug treatment. *J. Immunol.* 140:3315.
 139. Baron, C. y Penit, C. 1990. Study of the thymocyte cell cycle by bivariate analysis of incorporated bromodeoxyuridine and DNA

- content. *Eur. J. Immunol.* 20:1231.
140. Pilarski, L. M., Gillitzer, R., Zola, H., Shortman, K. y Scollay, R. 1989. Definition of the thymic generative lineage by selective expression of high molecular weight isoforms of CD45 (T200). *Eur. J. Immunol.* 19:589.
 141. Okumura, M., Fujii, Y., Inada, K., Nakahara, K. y Matsuda, H. 1992. CD45RA⁺R0⁺ subset is the major population of dividing thymocytes in the human thymus. *Eur. J. Immunol.* 22:3033.
 142. Nieto, M. A., González, A., López-Rivas, A., Díaz-Espada, F. y Gambón, F. 1990. IL-2 protects against anti-CD3-induced cell death in human medullary thymocytes. *J. Immunol.* 145:1364.
 143. Schorle, H., Höltschke, T., Hüning, T., Schimpl, A. y Horak, I. 1991. Development and function of T cells in mice rendered interleukin-2 deficient by gene targeting. *Nature.* 352:621.
 144. Rocha, B., Vassalli, P. y Guy-Grand, D. 1992. The extrathymic T-cell development pathway. *Immunol. Today.* 13:449.
 145. Anderson, G., Jenkinson, E. J., Moore, N. C. y Owen, J. T. 1993. MHC class II-positive epithelium and mesenchyme cells are both required for T-cell development in the thymus. *Nature.* 362:70.
 146. Papiernik, M., Penit, C. y El Rouby, S. 1987. Control of prothymocyte proliferation by thymic accessory cells. *Eur. J. Immunol.* 17:1303.
 147. de la Hera, A., Marston, W., Aranda, C., Toribio, M-L. y Martínez-A, C. 1989. Thymic stroma is required for the development of human T cell lineages in vitro. *Int. Immunol.* 1:471.
 148. Green, D. R., Bissonnette, R. P., Glynn, J. M. y Shi, Y. 1992.

- Activation-induced apoptosis in lymphoid systems. *Semin. Immunol.* 4:379.
149. Cohen, J. J. 1992. Glucocorticoid-induced apoptosis in the human thymus. *Semin. Immunol.* 4:363.
 150. Kishi, H., Borgulya, P., Scott, B. Karjalainen, K., Traunecker, A., Kaufman, J. y von Boehmer, H. 1991. Surface expression of the β T cell receptor (TCR) chain in the absence of other TCR or CD3 proteins on immature T cells. *EMBO J.* 10:93.
 151. Groettrup, M., Baron, A., Griffiths, G., Palacios, R. y von Boehmer, H. 1992. T cell receptor (TCR) β chain homodimers on the surface of immature but not mature α , γ , δ chain deficient T cell lines. *EMBO J.* 11:2735.
 152. Punt, J. A., Kubo, R. T., Saito, T., Finkel, T. H., Kathiresan, S., Blank, K. J. y Hashimoto, Y. 1991. Surface expression of a T cell receptor β (TCR- β) chain in the absence of TCR- α , - δ , and - γ proteins. *J. Exp. Med.* 174:775.
 153. Mombaerts, P., Iacomini, J., Johnson, R. S., Herrup, K., Tonegawa, S. y Papaioannou, V. E. 1992. RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell.* 68:869.
 154. Sinkai, Y., Koyasu, S., Nakayama, K-I., Murphy, K. M., Loth, D. Y., Reinherz, E. L. y Alt, F. W. 1993. Restoration of T cell development in RAG-2-deficient mice by functional TCR transgenes. *Science.* 259:822.
 155. von Boehmer, H. 1992. Thymic selection: a matter of life and death. *Immunol. Today.* 13:454.
 156. Krimpenfort, P., Ossendorp, F., Borst, J., Melie, C. y Berns, A.

1989. T cell depletion in transgenic mice carrying a mutant gene for TCR β . *Nature*. 341:742.
157. Nishimoto, N., Kubagawa, H., Ohno, T., Gartland, G. L., Stankovic, A. K. y Cooper, M. D. 1991. Normal pre-B cells express a receptor complex of μ heavy chains and surrogate light-chains proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 88:6284.
158. Brenner, M. B., Trowbridge, I. S. y Strominger, J. L. 1985. Cross-linking of human T cell receptor proteins: association between the T cell idiotype β subunit and the T3 glycoprotein heavy subunit. *Cell*. 40:183.